

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Dyroff)

Beiträge zur Frage der adrenocorticotropen Aktivität der Placenta

Der hohen medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
als Habilitationsschrift

vorgelegt von
Eberhard Strobel
Erlangen

1960



Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. R. DYROFF)

Untersuchungen über die adrenocorticotrope Aktivität menschlichen Placenta-Gewebes

Von

EBERHARD STROBEL

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. September 1960)

Von den zahlreichen Funktionen, welche der Placenta zugeschrieben werden, tritt ihre Beziehung zum endokrinen System in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Vordergrund.

Eine Reihe klinischer Beobachtungen und tierexperimenteller Untersuchungen weisen auf das Vorhandensein verschiedener Hormone in der Placenta hin.

HALBAN hat 1905 als erster die endokrine Funktion der Placenta auf Grund klinischer Beobachtungen erkannt und berichtet: „Wir haben Gründe, um anzunehmen, daß die aktiven Schwangerschaftssubstanzen von der Placenta stammen, deren Chorionepithelien eine innere Sekretion zugesprochen werden muß.“ Dies war die Entdeckung der Placenta als endokrines Organ. In dieser historischen Arbeit wurden ohne Anwendung differenzierter Untersuchungsmethoden grundlegende Erkenntnisse vorausgenommen, die sich im Laufe der folgenden 50 Jahre zum großen Teil bestätigt haben.

So gelang es z. B. ASCHNER und GRIGORIU durch Injektion von Placentabrei an Meerschweinchen Lactation hervorzurufen, während FELLNER dadurch Wachstumssteigerung am Genitale des Kaninchens beobachten konnte.

HIROSE, MURATA und ADACHI konnten nach Verabreichung von Placenta-Homogenaten aus dem 2. bis 4. Schwangerschaftsmonat sowie von Blasenmolen- und Chorionepitheliomgewebe Corpora lutea in den Ovarien der behandelten Versuchstiere beobachten.

Aber nicht nur im Tierversuch, sondern auch beim Menschen wurde die innersekretorische Wirksamkeit der Placenta studiert. So stellte unter anderen PHILIPP fest, daß bei der Implantation von Placentagewebe in die Bauchwand bei carcinomatösen Frauen eine Schwellung der Brüste mit Colostrumbildung auftrat, wobei reife Placenten wirksamer als jugendliche waren.

Meist benutzten die Autoren Placenta-Extrakte, die mehr oder weniger alle Hormone der Placenta enthielten. Die Versuchsergebnisse

waren jedoch nicht einheitlich und wurden deshalb verhältnismäßig wenig beachtet.

Die moderne Hormonforschung belebte durch das Auffinden neuer chemischer Methoden (Verteilungschromatographie, JR- und UV-Spektroskopie usw.) sowie empfindlicher, biologischer Analyse-Verfahren (biologische Tier-Teste) die Forschung über die innere Sekretion der Placenta.

In den Berichten von GUGGISBERG, A. MAYER, E. VOGT, SEITZ, LAHM, FELS und CLAUBERG aus den Jahren von 1926 bis 1936 gewann die Placenta im endokrinen System mehr und mehr an Bedeutung.

Heute wird gelegentlich von 9 bis 10 verschiedenen Hormonen gesprochen, die der Trophoblast bilden soll. Es besteht jedoch die Gefahr, daß die Placenta in dieser Hinsicht etwa das gleiche Schicksal erfährt wie der Hypophysenvorderlappen mit seinen einst 16 und mehr verschiedenen Hormonen, von denen zur Zeit sechs allgemein anerkannt werden.

Nach der zur Zeit vorherrschenden Meinung darf angenommen werden, daß in der Placenta sicher Choriongonadotropin (HCG), Oestrogene und Gestagene vorkommen und auch gebildet werden (PHILIPP, DISZFALUSY, AUGUSTIN, BICKENBACH, STEWART, KAUFMANN und ZANDER u. a.). Außerdem sind in der Placenta sicher Corticosteroide und wahrscheinlich Prolactin (LTH) und das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) vorhanden. Über die Bildung dieser drei letztgenannten Hormone in der Placenta liegen zur Zeit noch keine sicheren Angaben vor. Ebenso konnte bisher kein sicherer Nachweis für das Vorkommen von Stoffen mit androgener Wirksamkeit in der Placenta geführt werden (LABHART, SALHANICK, NOALL u. Mitarb., STAEMMLER, MAJNARICH und DILLON, JAILER und KNOWLTON, TARANTINO, OPSAHL und LONG, RIESS, CUNNINGHAM und KUHN u. a.).

Es steht jedoch außer Zweifel, daß die Placenta vom Beginn bis zum Ende der Gravidität Hormone von Steroid- und Eiweißnatur enthält und teilweise bildet, welche für die Erhaltung der Schwangerschaft und für die Vorbereitung des mütterlichen Organismus auf die Geburt unentbehrlich sind (LABHART).

Ein Überblick über die aus Placenta-Gewebe isolierten Hormone zeigt, daß noch viele Fragen ungeklärt sind. Durch eine Reihe von Untersuchungen haben wir versucht, zur Aufklärung einiger dieser offenen Fragen beizutragen. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Frage der adrenocorticotropen Aktivität menschlichen Placenta-Gewebes untersucht.

Die Fähigkeit des Chorionepithels, Proteohormone zu bilden, legte die Vermutung nahe, daß der Placenta auch die Synthese ACTH-wirksamer Substanzen zugesprochen werden kann.

Die diesbezüglichen Mitteilungen in der Literatur sind uneinheitlich. Dabei ist sowohl die Frage des Vorkommens als auch die der Bildung ACTH-aktiver Körper in der Placenta umstritten geblieben.

Eine Reihe von Autoren (JAILER und KNOWLTON, TARANTINO, OPSAHL und LONG, COHEN und KLEINBERG, BADINAND, MALLEIN und COTTE, SULMAN und BERGMANN, LUNDIN und HOLMDAHL u. a.) konnten aus menschlichen Placenten Verbindungen mit adrenocorticotroper Aktivität isolieren, die nach dem präparativ besonders spezifischen Vorgehen von ASSALI und HAMERMESZ (Oxycellulosetechnik von ASTWOOD) als dem hypophysären ACTH weitgehend identisch bezeichnet wurden.

ASSALI und HAMERMESZ erhielten aus menschlichem Placenta-Gewebe und aus dem Blut des intervillösen Raumes je zwei Fraktionen (Salzsäure-Aceton- und Oxycellulose-Technik), die auf ihre ACTH-Aktivität im Sayers-Test geprüft wurden. Dabei zeigten die mit der Oxycellulose gewonnenen Fraktionen eine auffallend hohe ACTH-Aktivität.

DISZFALUSY erzielte mit den für HCG-Untersuchungen hergestellten Salzextrakten aus menschlicher Placenta an hypophysektomierten Ratten keine adrenocorticotrope Reaktion. Dies spricht nach der Meinung des Autors jedoch nicht gegen das Vorhandensein adrenocorticotroper Substanzen im menschlichen Placenta-Gewebe.

BÖE und SALVESEN konnten in Placenta-Extrakten keine ACTH-Aktivität nachweisen.

LAX nimmt an, daß die Placenta die corticotropen Substanzen nicht selbst produziert, sondern daß die mütterliche Nebenniere über den Hypophysenvorderlappen stimuliert wird.

Nach ELERT ist nicht mit Sicherheit zu entscheiden, inwieweit die erhöhte Ausschüttung von ACTH während der Gravidität (ANSELMINO, HOFFMANN und HEROLD, JORES, REISS, PEGLAR und GOLLA, OPSAHL, LONG und FREY) hypophysären Ursprungs ist, da auch Placenta-Extrakte eine ACTH-Wirkung besitzen (JAILER und KNOWLTON, TARANTINO, JAILER, OPSAHL und LONG u. a.).

Da eine Reihe dieser Untersuchungen an nichthypophysektomierten Tieren durchgeführt wurde, bleibt die Frage offen, ob der corticotrope Effekt der verwendeten Extrakte wirklich auf ihrem ACTH-Gehalt oder auf der Stimulation der Adenohypophyse des Versuchstieres beruht (BLUMENTHAL).

In Anbetracht dieser unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse erscheint es uns wichtig, auf *die Frage des Vorkommens bzw. der Bildung oder Speicherung ACTH-aktiver Substanzen in der Placenta* näher einzugehen.

SULMAN und BERGMANN (1953) untersuchten Exttakte aus vier menschlichen Placenten hinsichtlich des C-Faktors des ACTH nach der Methode von SULMAN. Dabei fanden die Autoren, daß in der Placenta etwa 3- bis 12mal soviel von diesem Faktor vorhanden ist wie im vergleichsweise untersuchten Retroplacentarblut. Um den ACTH-Gehalt in anderen Organen zu prüfen, wurde Muskelgewebe, Uterus, Nieren- und Milz-Gewebe einer Hündin auf diesen Faktor hin untersucht. Hierbei zeigte sich, daß in keinem dieser Organe der ACTH-Gehalt höher als im Blut des Tieres lag. Aus diesen Ergebnissen wird von den Verfassern der Schluß gezogen, daß in der Placenta neben den bereits bekannten Hypophysenvorderlappen-Hormonen auch ACTH produziert wird.

Im Schrifttum ist wiederholt der Hinweis zu finden, daß während der Schwangerschaft eine vermehrte „adrenocorticale Aktivität“ besteht.

So fanden VENNING, TOBIAN, LLOYD, HUGHES, LOBOTSKY, RIENZO und AVERY ein zunehmendes Ansteigen der Corticoid-Ausscheidung beginnend in der Frühschwangerschaft mit einem Maximum im letzten Drittel der Gravidität.

GRANIRER konnte im Plasma post partum mit dem Sayers-Test eine erhöhte ACTH-Aktivität nachweisen.

GEMZELL zeigte 1953, daß der Blutspiegel der 17-Hydroxy-corticosteroide in der Frühschwangerschaft anzusteigen beginnt und bis kurz nach der Geburt erhöht bleibt. Er führte diesen Anstieg teilweise auf eine Stimulation der mütterlichen Nebenniere durch übermäßige während der Gravidität vorhandene Mengen von Oestrogenen und auf eine verstärkte Aktivität der fetalen Nebenniere zurück.

Im Hinblick auf die in der Literatur vorliegenden, teilweise gegensätzlichen Meinungen über die ACTH-Aktivität menschlichen Placentagewebes versuchten wir zunächst die folgenden Fragen zu klären.

1. Ist in der reifen, menschlichen Placenta eine ACTH-Aktivität nachzuweisen?
2. Besteht ein Unterschied in der ACTH-Aktivität verschiedener, menschlicher Placenten?

Arbeitsmethoden

Auswahl der Versuchstiere

Aus operationstechnischen und wirtschaftlichen Gründen wurden die biologische Testung der menschlichen Placentaextrakte sowie die späteren tierexperimentellen Untersuchungen an Ratten durchgeführt.

Für sämtliche Untersuchungen verwendeten wir reingezüchtete Ratten eines Wistar-Stammes¹, um den Forderungen nach einer weitgehenden Homogenität des Tiermaterials zu entsprechen. Diesem Stamm, der von uns in bisher 30 Generationen weitergezüchtet und laufend auf seine ACTH-Empfindlichkeit getestet wurde, entnahmen wir sämtliche, für unsere Untersuchungen benötigten, über

¹ Für die Überlassung von Zuchttieren danken wir der Firma Hoechst.

500 Tiere. Unterbringung, Pflege und Fütterung war für alle Tiere vollkommen gleichartig. Die Ernährung erfolgte mit einem hormonfreien Spezialfutter¹.

Ermittlung der Eichkurve

Für die Auswertung der nachfolgenden Versuchsergebnisse war zunächst die Aufstellung einer Eichkurve erforderlich.

Dabei wurde im Rahmen des Sayers-Testes insgesamt 24 hypopjysektomierten Ratten ein ACTH-Präparat² als Standard in einer Dosierung von 1,56, 3,12 und 6,25 IE verabreicht und der Ascorbinsäure-Abfall in den Nebennieren nach der Methode von ROE und KUETHER bestimmt.

Die statistische Bearbeitung der Werte der „Eichkurve“ erfolgte in Form einer Varianzanalyse, wobei zur Erleichterung der Rechnung die verabreichten Dosen nicht mit ihren absoluten Werten, sondern als Verhältnis ihrer Logarithmen 1:2:3 eingesetzt wurden. Damit ergibt sich nun folgendes Rechenschema:

Tabelle 1. Ascorbinsäure-Abfall in Abhängigkeit von der Dosis eines ACTH-Standards bei 24 Ratten

	Dosis x			
	1	2	3	
Ascorbin- säure- abfall y	23	110	191	
	23	111	194	
	24	117	200	
	25	120	212	
	28	124	228	
	34	125	232	
	36	126	238	
	39	127	248	
$\sum \frac{y_i}{y_i}$	232	960	1743	2935 = Y
$\sum \frac{y_i}{y_i}$	29	120	218	= $\sum y_{ij}$
$\sum y_i^2$	17726	115516	383017	516259 = $\sum y_{ij}^2$

Mit diesen Werten ergibt sich folgende Streuungszerlegung:

$$S_G = \sum y_{ij} - \frac{1}{kl} \cdot Y^2 = 516259 - \frac{2935^2}{24} = 157333,$$

$$S_1 = \frac{1}{K} \sum Y_i^2 - \frac{1}{kl} \cdot Y^2 = \frac{1}{8} (232^2 + 960^2 + 1743^2) - \frac{2935^2}{24} = 142758,$$

$$S_2 = S_G - S_1 = 14575.$$

Zur Berechnung der Regressionsgeraden erhält man weiterhin:

$$\bar{x} = 2 \cdot \bar{y} = \frac{2935}{24} = 122,292, \quad S_{xx} = 16,$$

$$S_{xy} = 1511,$$

wobei

$$S_{xy} = \sum_i (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})$$

und

$$S_{xx} = \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{ist.}$$

¹ „Altromin-R“ (Fa. Altrogge, Lage/Lippe).

² Acethropan (ACTH „Hoechst“).

Daraus ergibt sich für die Steigung der Regressionsgeraden $G_R = a + bx$

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{1511}{16} = 94,4375$$

und
$$a = \bar{y} + b(x - \bar{x}) = 122,292 - 2 \cdot 94,4375 = -66,583.$$

Die Gleichung der Regressionsgeraden im halblogarithmischen System lautet daher:

$$G_R = -66,583 + 94,4375 x.$$

Es läßt sich nun prüfen, ob die Regression linear ist. Man erhält als Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) 1. für die Regressionsgerade

$$b \cdot S_{xy} = \frac{1511^2}{16} = 142695 = S_3$$

und 2. für die Abweichungen von der Regressionsgeraden

$$\sum n_i (\bar{y}_i - y_{iR})^2 = 63,0 = S_4$$

Das vollständige Streuungs-Zerlegungsschema lautet damit:

Tabelle 2

	SA Q	Zahl der Freih. f.	MA Q ¹	F	Statistische Sicherheit
Regressionsgerade S_3	142695	1			
Abweichung von der Regressionsgeraden S_4	63,0	1			
Zwischen den Dosen S_1	142758,0	2	71379	102,85	$\gg 99,9\%$
Rest (innerhalb) S_2	14575	21	694,05		
Gesamt S_G	157333	23			

¹ MA Q = Mittleres Abweichungsquadrat.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Eichkurve statistisch völlig gesichert eine Gerade darstellt (vgl. Zeile 1, Tabelle 2) und die Abweichungen von dieser Geraden (Zeile 2, Tabelle 2) nur einen Bruchteil der im gesamten Material vorhandenen Reststreuung S_2 darstellen.

Für die Eichkurve ist weiterhin: die Streuung des Regressionskoeffizienten

$$s_b = \sqrt{\frac{S_{yy} - b S_{xy}}{(n-2) S_{xx}}} = \sqrt{\frac{14638}{352}} = 6,45,$$

wobei dieser ebenfalls völlig zu sichern ist nach der Formel

$$t = \frac{b}{s_b} = \frac{94,4}{6,45} = \underline{14,6}.$$

Ferner wird der Korrelationskoeffizient

$$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}} = \frac{1511}{\sqrt{16 \cdot 157333}} = \underline{0,95235}.$$

Die mittleren Abweichungen der Einzelwerte y_i von der Regressionsgeraden sind

$$s_y = s_y \cdot \sqrt{1 - r^2} = \sqrt{\frac{S_{yy}}{n-1}} \cdot \sqrt{1 - r^2} = \sqrt{\frac{157333}{23}} \cdot \sqrt{0,09303} = \pm 25,2.$$

Der mittlere Fehler des bei der mittleren Dosis erzeugten Ascorbinsäure-Abfalls beträgt, als Abweichung von der Regressionsgeraden berechnet:

$$s_{yR} = s_b \cdot \sqrt{\frac{S_{xx}}{n} + (x - \bar{x})^2} = 6,45 \cdot \sqrt{\frac{16}{24}} = \pm 5,25.$$

d. h. der Mittelwert beträgt

$$\begin{aligned} \bar{y} &= 122,3 \pm 5,25 \\ &= 122,3 \pm 4,3\% \end{aligned}$$

Die Eichkurve stellt im halblogarithmischen System eine statistisch völlig gesicherte Gerade dar.

Chemische

Aufarbeitung des Placenta-Gewebes

Bei der chemischen Aufarbeitung der menschlichen Placenten gingen wir nach der Methode vor, wie sie LI, EVANS und SIMPSON für die Isolierung von ACTH aus frischen Schweine-Hypophysen angegeben haben, und zwar wie folgt.

Die Placenta wurde unmittelbar nach der Geburt kurz unter fließendem Wasser von anhaftenden Blutresten gereinigt und durch Abtupfen mit Filterpapier sorgfältig getrocknet.

200 g Placenta-Gewebe wurden grob zerkleinert, in 100 ml destilliertem Wasser mit dem Ultra-Turrex unter Kühlung homogenisiert, unter Rühren eine Mischung von 200 ml 36,4%iger Salzsäure und 600 ml Aceton hinzugefügt und die Aufschwemmung 1 Std bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend zentrifugierten wir die Aufschwemmung 30 min bei 3000 U/min zwischen -8 und -10°C in der Kühlzentrifuge, filtrierten die überstehende Flüssigkeit und zentrifugierten (1 Std bei 3000 U/min) den Rückstand nach Auswaschung mit Aceton-Salzsäure erneut in der Kühlzentrifuge. Die überstehende, klare bernsteinfarbene Flüssigkeit wurde wiederum filtriert und der feste, braun-graue Rückstand verworfen.

Zu dem gewonnenen Filtrat gaben wir zur Ausfällung 3,2 Liter Aceton und kühlten die Lösung 12 Std unter -5°C .

Schließlich konnte die ausgefällte Substanz abgenutscht, mit vorgekühltem Aceton ausbwaschen und im Vakuum getrocknet werden.

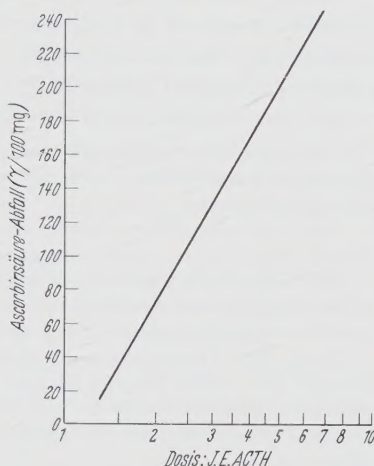


Abb. 1. Eichkurve

Tabelle 3. Quantitative Ausbeute an Trockensubstanz aus fünf verschiedenen Placenten

Placenta-Extrakt	Frischgewicht g	Trockensubstanz g	Trockensubstanz pro 100 g Frisch-Gewicht g
A	200	3,4430	1,7220
B	200	3,5420	1,5140
C	300	5,3823	1,7441
D	300	4,9200	1,6400
E	300	5,3270	1,7757
Mittelwert			1,6892

Unter Anwendung dieses Verfahrens konnte eine weiß bis grau gefärbte Trockensubstanz gewonnen werden. Die quantitative Ausbeute an Trockensubstanz geht aus der Tabelle 3 hervor.

Biologische Auswertung

Die Trockensubstanzen der fünf verschiedenen Placenta-Extrakte wurden im Tierversuch (Sayers-Test) auf ihre ACTH-Aktivität geprüft.

Die biologische Testung jeder Trockensubstanz erfolgte in zwei Versuchsreihen an je 9 Ratten. Somit waren zur Austestung der oben angeführten Placenta-Extrakte einschließlich der Kontrolltiere insgesamt 110 Ratten erforderlich.

Bei der *Durchführung des Sayers-Testes* gingen wir wie folgt vor:

Am ersten Tag wurden pro Versuch 12 bis 14 140 ± 20 g schwere, männliche Ratten in Äther-Narkose nach der parapharyngealen Methode von P. E. SMITH hypophysektomiert.

Am zweiten Tag führten wir bei diesen Tieren zunächst eine linksseitige Adrenalektomie nach der im Sayers-Test angegebenen Methode durch.

Die Nebenniere wurde sofort nach der Entnahme auf angefeuchtetem Filterpapier sorgfältig von dem umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit und in einem verschlossenen Wägegläschen auf einer analytischen Waage gewogen.

Nach dem Wiegen wurde die Nebenniere mit einigen Körnchen ausgeglühtem Seesand und einem Tropfen 4%iger Trichloressigsäure in einem Zentrifugenglas zerrieben. Schließlich gaben wir zu dem vollständig zerriebenen Organ 12 ml 4%iger Trichloressigsäure und ließen das Ganze bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis zum nächsten Tag stehen.

Unmittelbar nach der linksseitigen Adrenalektomie verabreichten wir die auf ACTH zu testende Substanz bzw. das ACTH-Standard-Präparat intravenös in die Schwanzvene der Ratte. Eine Stunde später wurde die rechte Nebenniere entnommen, gewogen, zerkleinert und ebenfalls bei $+4^{\circ}\text{C}$ in Trichloressigsäure aufbewahrt.

Am dritten Tag führten wir die Ascorbinsäurebestimmung nach der Methode von ROE und KUETHER durch. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Überführung der Ascorbinsäure in Dehydroascorbinsäure, die mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin behandelt wird. Das so gebildete Osazon geht durch Einwirkung von Schwefelsäure in ein gefärbtes Oxydationsprodukt über. Die Färbung, die photometrisch bestimmt wird, ist direkt proportional der Ascorbinsäurekonzentration.

Zur *Durchführung der Ascorbinsäurebestimmung* versetzten wir den mit Trichloressigsäure gewonnenen Nebennieren-Extrakt mit 300 mg Aktivkohle, schüttelten gut durch und filtrierten dann zweimal durch dasselbe Filter. Von diesem Filtrat wurden zweimal 4 ml in zwei Reagensgläser pipettiert, mit je einem Tropfen 10%iger alkoholischer Thioharnstofflösung versetzt und geschüttelt. Dann gaben wir je 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung zu und schüttelten die Lösung nochmals.

Anschließend wurden die Reagensgläser für 3 Std in ein Wasserbad mit einer konstanten Temperatur von 37°C gestellt, danach in einem Eisbad gekühlt und sehr langsam mit 7 ml 85%iger Schwefelsäure aufgefüllt.

Nach sorgfältigem Durchmischen blieb die Lösung 30 min bei Zimmertemperatur stehen. Schließlich wurde die Extinktion der Lösung am Stufenphotometer (Filter: S 53, Schichtdicke 10 mm) gegen eine aus 4 ml 4%iger Trichloressigsäure bestehende Leerprobe, die genauso behandelt wurde wie die Extrakte, gemessen.

An Hand einer vorher angefertigten Eichkurve ließ sich die Ascorbinsäuremenge bestimmen.

In jeder Versuchsreihe wurde nach der oben beschriebenen Technik je drei Ratten eine Dosis von 2,5 mg (D_1), 5 mg (D_2) und 10 mg (D_3) in je 0,5 ml dest. Wasser gelöste Trockensubstanz intravenös verabreicht und der Ascorbinsäure-Abfall zwischen beiden Nebennieren bestimmt (s. Tabelle 4).

Die Tabelle 4 zeigt den Ascorbinsäure-Abfall bei 90 Ratten in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis menschlicher Placenta-Extrakte und die entsprechenden Mittelwerte.

LI u. Mitarb. konnten bei ihren Untersuchungen über die Isolierung von ACTH aus Schweine-Hypophysen zeigen, daß das gewonnene Roh-extrakt (Acid-Acetone-Powder, L_1 , EVANS und SIMPSON), welches unserer Trockensubstanz entspricht, außer ACTH lediglich das luteotrophe Hormon (Prolactin = LTH) sowie die gesamten Hypophysen-Hinterlappenhormone neben inaktiven Proteinen enthält, während das gonadotrope, das thyreotrope und das Wachstums-Hormon in den Extraktionsrückständen verbleibt.

Auf das Extraktionsverfahren des Placenta-Gewebes übertragen, würde dies bedeuten, daß wir in unserer Trockensubstanz neben ACTH und inaktiven Proteinen vor allem LTH zu erwarten haben.

Wir prüften deshalb den *Einfluß von LTH auf den Sayers-Test*.

Im Rahmen dieses Testes verabreichten wir von insgesamt 18 hypophysectomierten Ratten 4 Tieren je 6,25 IE ACTH, 10 Versuchstieren je 10 IE LTH¹ und 4 Ratten je 6,25 IE ACTH und je 10 IE LTH.

Tabelle 4. *Ascorbinsäure-Abfall in Dosisabhängigkeit bei fünf verschiedenen, menschlichen Placenta-Extrakten (90 Ratten)*

Pla-centa-Extrakt	Dosis mg	Ascorbinsäure-Abfall						Mittelwert
A	2,5	38	36	42	34	40	45	41
	5	112	120	115	108	104	113	112
	10	175	190	182	178	178	177	180
B	2,5	30	29	38	35	33	39	34
	5	105	102	92	118	98	95	100
	10	170	172	162	156	166	158	164
C	2,5	32	25	23	20	35	36	30
	5	90	94	87	89	92	100	92
	10	150	156	142	161	161	166	156
D	2,5	20	32	30	29	32	31	29
	5	74	80	90	88	78	86	84
	10	140	130	148	135	145	136	139
E	2,5	25	32	36	27	28	26	29
	5	80	91	95	76	82	92	86
	10	140	134	149	151	147	143	144

¹ Ferring, Malmö, Schweden.

Wie die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, hatte LTH unter den angegebenen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Einfluß auf die Wirkung der verabreichten ACTH-Dosis.

Statistische Bearbeitung der Ergebnisse

Die statistische Aufarbeitung der Werte des Ascorbinsäure-Abfalls, die sich bei Verabreichung von menschlichen Placenta-Extrakten ergaben, erfolgt wieder im Schema der *Varianzanalyse*, wobei die Bestimmungen mit den fünf verschiedenen Extrakten (A bis E) als „Wiederholungen“ aufgefaßt werden und ebenfalls wieder im halblogarithmischen System gerechnet wird. Die verabreichten Dosen 2,5, 5,0 bzw. 10,0 mg stehen in diesem System im Verhältnis 1:2:3.

Aus der Ausgangstabelle 4 erhält man folgende Tabelle 5 der Wiederholungssummen:

Tabelle 5

	Dosis x			Y_k	Y_k^2
	2	2	3		
A	246	672	1080	1998	3992004
B	204	600	984	1788	3196944
C	180	552	936	1668	2782224
D	174	504	834	1512	2286144
E	174	516	864	1554	2414916
Y_1	978	2884	4698	8520	14672232
Y_1^2	956484	8088336	22071204		
Y_1^3	31116024				

Da die Summe der Quadrate aller Einzelwerte $\sum y_{kl} = 1049715$ ist, ergeben sich als Streuungserlegung der Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) folgende Werte:

$$1. \text{ Insgesamt } S_G = 1049715 - \frac{8520^2}{90} = 243155.$$

2. Zwischen allen Wiederholungsgruppen:

$$S_1 = \frac{1}{6} (246^2 + 672^2 + 1080^2 + 204^2 + \dots + 864^2) - \frac{8520^2}{90} \\ = 1047408 - 806560 = 240848.$$

3. Zwischen den Dosen:

$$S_2 = \frac{1}{30} (978^2 + 2884^2 + 4698^2) - \frac{8520^2}{90} = 230640,8.$$

4. Zwischen den Behandlungsarten A, B, C, D, E:

$$S_3 = \frac{1}{18} (1998^2 + 1788^2 + 1512^2 + 1554^2) - \frac{8520^2}{90} = 8564.$$

5. Als „Wechselwirkung“ $D \times B$:

$$S_4 = S_1 - S_2 - S_3 = 1643,2 \quad \text{und}$$

6. als „Rest“ innerhalb des gesamten Materials

$$S_5 = S_G - S_1 = 2307.$$

Nachdem bei der Auswertung der „Eichkurve“ im einzelnen beschriebenen Verfahren lassen sich folgende Werte für die Regressionsgerade des Gesamtmaterials errechnen.

Es ist hier:

Die Steigung $b = 62,0$, die SAQ für die Regressionsgerade 230 640, die Abweichungen von der Linearität der Regressionsgeraden 0,8, so daß folgendes Schema der Streuungserlegung aufgestellt werden kann:

Tabelle 6. *Streuungserlegung*

	SAQ	<i>f</i>	MAQ	<i>F</i>	Statistische Sicherheit
Regressionsgerade	230 640	1			
Abweichungen von der Regressionsgeraden . .	0,8	1			
Zwischen den Dosen S_2 . .	230 640,8	2	115 320,4	3749	$\gg 99,9\%$
Zwischen den Behandlungsarten S_3	8 564	4	2 141	66,36	$\gg 99,9\%$
Wechselwirkung $D \times B$ S_4 .	1 643,2	8	205,4	6,68	$> 99,9\%$
Rest innerhalb S_5	2 307	75	30,76		
Gesamt S_G	243 155	89			

Hieraus folgert, daß sich

1. zwar eine gemeinsame Regressionsgerade, die völlig linear ist, aufstellen läßt, daß aber andererseits

2. sowohl die Wechselwirkung $D \times B$, wie auch der Unterschied zwischen den Behandlungsarten völlig gesichert ist, so daß die gemeinsame Regressionslinie nur eine untergeordnete Bedeutung besitzt.

Es war deshalb zur Sicherung dieser Aussage weiterhin zu prüfen, ob die den Versuchen A bis E ermittelten Werte des Ascorbinsäure-Abfalls sich in Form paralleler Geraden darstellen lassen oder ob die Steigungen dieser Geraden statistisch gesichert voneinander abweichen. Zu diesem Zweck wurden für alle Materialteile (Versuche A bis E) einzeln die Steigungen und die SAQ der jeweiligen Regressionsgeraden errechnet und in nachstehender Tabelle 7 zusammengefaßt, wobei in der vorletzten Zeile (G) die Werte für die gemeinsame, mittlere Regressionsgerade des Gesamtmaterials, in der letzten Zeile (Rest) die Differenzen zwischen den beiden darüberstehenden Zahlen angegeben sind.

Tabelle 7. Berechnung der Regressionsgeraden

	$S_{\bar{x}\bar{x}}$	$S_{\bar{x}\bar{y}}$	S_{yy}	b	$n_i b S_{\bar{x}\bar{y}}$	Σd^2	L
A	2	139	58358	69,5	57963	395	9,0
B	2	130	50979	65,0	50700	279	4,0
C	2	126	48260	63,0	47628	632	4,0
D	2	110	36736	55,0	36300	436	0,0
E	2	115	40258	57,5	39675	583	1,0
Summe			234591		232266	2315 (4)	1,80 (7)
G	2	124	243155	62,0	230640	12515 (5)	0,8
Rest			8564 (2)		1626 (3)	10190 (1)	1,72 (6)

Zur Erläuterung sei noch angegeben, daß $n_i b S_{\bar{x}\bar{y}}$ die SAQ der jeweiligen Regressionsgeraden, $\Sigma d^2 = S_{yy} - n_i b S_{\bar{x}\bar{y}}$ und L die Abweichungen von der Linearität der Regressionsgeraden sind.

Unter Vergleich mit der Streuungszerlegung des Gesamtmaterials (Tabelle 6) läßt sich nun folgende Streuungszerlegung für die Parallelität der Regressionsgeraden aufstellen (Tabelle 8):

Tabelle 8

	Σd^2	f	MAQ	F	Statistische Sicherheit
Abweichungen von der Parallelität der Regressionsgeraden	10190 (1)	7	1455,71	491,4	$\gg 99,9\%$
Zurückzuführen auf:					
Abweichungen zwischen Behandlungsarten	8564 (2)	4	2141	72,3	$\gg 99,9\%$
Abweichung von der mittleren, gemeinsamen Regressionsgeraden	1626 (3)	3	542	18,3	$\gg 99,9\%$
Abweichungen aller Einzelregressionsgeraden zusammen	2325 (4)	80	29,625		
Abweichungen von der gemeinsamen Regressionsgeraden .	12515 (5)	87			

Zur Beurteilung der Frage, ob die Einzelregressionsgeraden statistisch verschieden sind oder nicht, genügt an und für sich die Betrachtung der Zeile (1) und (4) der Tabelle 8. Das MAQ der Zeile (1) ist statistisch völlig gesichert größer als das der Zeile (4). Bei näherer Betrachtung ist ferner festzustellen, daß das MAQ (1) = 10190 sich aufspalten läßt in die Abweichungen zwischen den Behandlungsarten (2) = 8564 und die Abweichungen von der gemeinsamen, mittleren Regressionsgeraden (3) = 1626. Der erste dieser beiden Werte ist offenbar der Ausdruck dafür, daß sich die Mittelwerte des Ascorbinsäure-Abfalls bei den Versuchen A bis E gesichert voneinander unterscheiden,

während der zweite (3) ein Maß dafür ist, daß die Steigungen der fünf verschiedenen Regressionsgeraden statistisch gesichert voneinander abweichen.

Des weiteren fällt von hier aus ein Licht auf die „Wechselwirkung $D \times B$ “ = 1643,2 der Tabelle 6 (Streuungszerlegung des Gesamtmaterials). Diese setzt sich zusammen aus den Abweichungen der Steigungen derjenigen der mittleren Geraden (3) = 1626 und der Summe der Abweichungen von der Linearität der einzelnen Geraden, die am unteren Ende der Spalte L in Tabelle 7 als Rest (6) = 17,2 angegeben ist.

Um die Summe (7) aus Spalte L = 18 Einheiten ist dafür in Tabelle 8 die Abweichung aller Einzelregressionsgeraden (4) = 2325 größer als der „Rest“ $S_5 = 2307$ der Tabelle 6.

Ferner wurden, wie bei der Eichkurve, die Gleichungen der Regressionsgeraden aufgestellt und die Streuungen der Regressionskoeffizienten s_b , die Prüfgröße T zur Sicherung dieser Koeffizienten, die Korrelationskoeffizienten r_{xy} , die mittleren Abweichungen s_y der Einzelwerte y_{ij} von der Regressionsgeraden, die mittleren Abweichungen s_{yR} der Mittelwerte von der Regressionsgeraden s_{yR} berechnet und mit den jeweiligen Mittelwerten in der Tabelle 9 (Übersicht) zusammengestellt.

In der Spalte T treten nur Zahlen größer als 14,6 auf. Da

Tabelle 9. Übersicht

	n	S_{yy}	Gleichung der Regressionsgeraden	Steigung der Regressionsgeraden b	s_b	T	r_{xy}	s_y	s_{yR}	Mittelwert $M \pm s_{yR}$
Eichkurve . .	24	157333	$y_R = -66,6 + 94,4 x$	94,4	$\pm 6,45$	14,6	0,95235	$\pm 25,2$	$\pm 5,25$	$122,3 \pm 5,25 = 122,3 \pm 4,3\%$
Gesamtmaterial der Placenten	90	243155	$y_R = -29,3 + 62,0 x$	62,0	$\pm 1,54$	40,3	0,9739	$\pm 11,87$	$\pm 2,0$	$94,7 \pm 2,0 = 94,7 \pm 2,1\%$
Gruppe A . .	18	58358	$y_R = -28,0 + 69,5 x$	69,5	$\pm 1,44$	48,3	0,99662	$\pm 4,81$	$\pm 1,18$	$111,0 \pm 1,18$
Gruppe B . .	18	50979	$-30,7 + 65,0 x$	65,0	$\pm 1,20$	54,3	0,99725	$\pm 4,06$	$\pm 0,98$	$99,3 \pm 0,98$
Gruppe C . .	18	48260	$-33,3 + 63,0 x$	63,0	$\pm 1,82$	34,8	0,99346	$\pm 6,10$	$\pm 1,47$	$92,7 \pm 1,47$
Gruppe D . .	18	36736	$-26,0 + 55,0 x$	55,0	$\pm 1,51$	36,5	0,99366	$\pm 5,22$	$\pm 1,23$	$84,0 \pm 1,23$
Gruppe E . .	18	40258	$-28,7 + 57,5 x$	57,5	$\pm 1,74$	33,0	0,99272	$\pm 6,58$	$\pm 1,42$	$86,3 \pm 1,42$

eine statistische Sicherheit von 99,9% bei $n = 18$ dann vorhanden ist, wenn $T > 3,92$ ist, bedeutet dies, daß die Steigung b und damit der Regressionskoeffizient r_{xy} in allen Fällen dieser Tabelle völlig gesichert ist.

Ferner wurde mit Hilfe der Formel

$$b = 1,1513 \cdot \sqrt{\frac{(n_1 - 3)(n_2 - 3)}{n_1 + n_2 - 6}} \cdot \log \frac{1 + r_1}{1 - r_1} \frac{1 - r_2}{1 + r_2}$$

geprüft, ob zwei Korrelationskoeffizienten (KK) statistisch gesichert voneinander abweichen. Beim Vergleich der KK der Eichkurve und des Gesamtmaterials ergibt sich ein Q von 1,26, d. h. der Unterschied kann

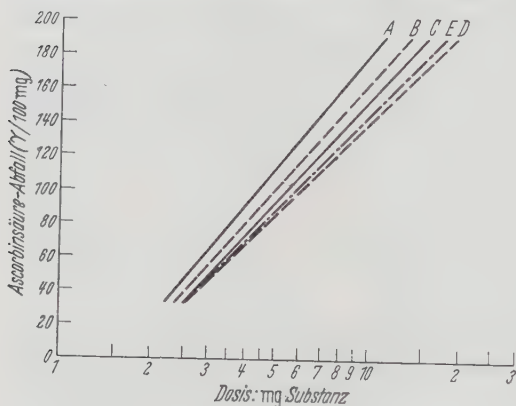


Abb. 2. Placenta-Extrakte (A—E). (Mittelwert 90 Tiere)

wegen der großen Streuung in beiden Teilen nicht einmal „wahrscheinlich“ gemacht werden.

Dagegen ist der Unterschied zwischen den KK der Eichkurve und der Gruppe A statistisch mit 99,9%-iger Wahrscheinlichkeit gesichert ($Q = 4,0 > 3,5$).

Das gleiche gilt für die KK der anderen Gruppen (B bis E).

Die Ergebnisse der vorangehenden statistischen Bearbeitung können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Nach dem Schema der Streuungserlegung läßt sich für das gesamte Material, statistisch völlig gesichert, eine gemeinsame Regressionsgerade aufstellen.
2. Sowohl die Wechselwirkung $D \times B$ wie auch der Unterschied zwischen den einzelnen Placenta-Extrakten ist statistisch völlig gesichert, so daß eine gemeinsame Regressionslinie nur eine untergeordnete Bedeutung besitzt.
3. Es läßt sich statistisch sichern, daß sich die Mittelwerte des Ascorbinsäure-Abfalls bei den Versuchen A bis E unterscheiden.
4. Die Steigung der fünf verschiedenen Regressionsgeraden unterscheiden sich statistisch gesichert auf Grund des Ergebnisses der durchgeführten Variananalyse.

Ergebnisse

Für die Auswertung unserer vorangehenden und nachfolgenden Versuchsergebnisse war zunächst die Aufstellung einer Eichkurve

erforderlich. Die Eichkurve stellt im halblogarithmischen System eine statistisch völlig gesicherte Gerade dar (Abb. 1, Tabelle 1 und 2).

Bei unseren Untersuchungen über die ACTH-Aktivität menschlichen Placenta-Gewebes wurde festgestellt, daß *im menschlichen Placenta-Gewebe am Ende der Gravidität* unter den angegebenen Versuchsbedingungen *eine ACTH-Aktivität nachweisbar* ist.

Die Prüfung fünf verschiedener, reifer, menschlicher Placenta-Extrakte auf ihre ACTH-Aktivität an 90 Ratten zeigte einen statistisch gesicherten Unterschied zwischen den einzelnen Placenta-Extrakten. Das heißt *es besteht ein Unterschied in der ACTH-Aktivität verschiedener, reifer, menschlicher Placenten* (Abb. 2, Tabelle 4 und 9).

Wie aus der Übersichtstabelle 9 in Verbindung mit der Eichkurve (Abb. 1, Tabelle 1) hervorgeht, war bei den fünf verschiedenen Placenta-Extrakten im Mittelwert eine ACTH-Aktivität von $2,85 \text{ IE} \pm 1,1\%$ (A), $2,6 \text{ IE} \pm 0,9\%$ (B), $2,5 \text{ IE} \pm 1,6\%$ (C), $2,34 \text{ IE} \pm 1,5\%$ (D) und $2,4 \text{ IE} \pm 1,6\%$ (E) je 5,0 mg Trockensubstanz festzustellen.

Auf alle untersuchten Placenta-Extrakte (A bis E) bezogen, würde dies im Mittelwert eine Aktivität von $2,54 \text{ IE ACTH} \pm 1,3\%$ pro 5,0 mg Placenta-Trockensubstanz bedeuten.

Mit diesen Untersuchungen ist noch nicht geklärt, ob sich auch in *unreifen*, menschlichem Placenta-Gewebe eine ACTH-Aktivität nachweisen läßt und in welchem Schwangerschaftsmonat eventuell ein Maximum an ACTH-Aktivität zu finden ist.

Diese Fragen müssen späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Dabei ist besonders auf die Verwendung von nur frischem Placenta-Gewebe für die Aufarbeitung zu achten. Placenta-Gewebe von Aborten ist u. E. für diese Untersuchungen nicht geeignet, da mit diesen Ergebnissen an nicht mehr intaktem Material keine sichere Aussage über die quantitative Ausbeute an wirksamer Substanz erfolgen könnte.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde über Untersuchungen zur Frage der adrenocorticotropen Aktivität menschlichen Placenta-Gewebes berichtet.

Für die Auswertung der Versuchsergebnisse war zunächst die Ermittlung einer Eichkurve mit einem ACTH-Präparat als Standard erforderlich.

Die Frage der adrenocorticotropen Aktivität menschlichen Placenta-Gewebes wurde nach vorhergehender, chemischer Aufarbeitung von fünf reifen, menschlichen Placenten mit Hilfe einer speziellen, biologischen Test-Methode an Ratten geprüft und zu beantworten versucht.

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen ist in der reifen, menschlichen Placenta eine adrenocorticotrope Aktivität nachzuweisen.

Es besteht jedoch ein Unterschied in der ACTH-Aktivität verschiedener, reifer, menschlicher Placenten.

Diese Arbeit wurde im November 1959 abgeschlossen¹.

Zusammenstellung der bei den statistischen Berechnungen verwendeten Bezeichnungen

- 1, SAQ = Summe der Abweichungsquadrate.
- 1a, S_{xx} = $\Sigma (x - \bar{x})^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate x .
- 1b, S_{yy} = $\Sigma (y - \bar{y})^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate y .
- 1c, S_{xy} = $\Sigma (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ = Summe der Abweichungsquadrate des Produktes $x y$.
- 2, f = Zahl der Freiheitsgrade.
- 3, MAQ = mittleres Abweichungsquadrat.
- 4, b = Steigung der Regressionsgeraden.
- 5, $n_i b S_{\bar{x}\bar{y}}$ = $b S_{\bar{x}\bar{y}}$ = die SAQ der jeweiligen Regressionsgeraden.
- 6, L = Abweichungen von der Linearität der Regressionsgeraden.
- 7, Σd^2 = $S_{yy} - b S_{xy}$ = „Reststreuung“.
- 8, s_y = die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} vom Mittelwert y
- 9, s_b = Streuung des Regressionskoeffizienten.
- 10, T = Prüfgröße (zur Sicherung des Regressionskoeffizienten).
- 11, r_{xy} = Korrelationskoeffizient.
- 12, $s_{y'}$ = die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} von der Regressionsgeraden.
- 13, s_{yR} = die mittlere Abweichung des Mittelwerts vom Mittelwert der Regressionsgeraden.
- 14, G_R = Gleichung der Regressionsgeraden.
- 15, L = Abweichung von der Linearität der Regressionsgeraden.

Die statistischen Berechnungen wurden nach KOLLER, MITTEN-ECKER, GRAF und HENNING durchgeführt.

Literatur

- ANSELMINO, K. J., F. HOFFMANN u. L. HEROLD: Über die adrenaltrope Wirkung von Hypophysenvorderlappenextrakten. *Klin. Wschr.* **12**, 1944 (1933).
 — — — Das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens. *Arch. Gynäk.* **157**, 86 (1934).
 — — — Über das corticotrope Hormon des HVL. *Klin. Wschr.* **13**, 209 (1934).
 — — — Abgrenzung des Fettstoffwechselhormons des HVL vom thyreotropen Hormon. *Z. exp. ges. Med.* **94**, 323 (1934).
 ASCHNER, B., u. CH. GRIGORIU: Placenta, Fötus und Keimdrüse in ihrer Wirkung auf die Milchsekretion. *Arch. Gynäk.* **94**, 766 (1911).
 ASSALI, N. S., u. J. HAMERMESZ: Adrenocorticotrophic substances from human placenta. *Endocrinology* **55**, 561 (1954).
 ASTWOOD, E. B., M. S. RABEN, R. W. PAYNE and A. B. GRADY: Purification of corticotropin with oxycellulose. *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 2969 (1951).

¹ An dieser Stelle darf ich dem Chemiker der Klinik, Herrn Dr. rer. nat. R. DITTMAYER, für die Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit, dem Physiker der Klinik, Herrn Dr. phil. A. REUSS, für die Mithilfe bei den statistischen Berechnungen, und Fräulein Dr. rer. nat. S. ROHN für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Untersuchungen herzlich danken.

- AUGUSTIN, E.: Gehalt in der Placenta an gonadotropem Hormon in den einzelnen Schwangerschaftsmonaten. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **197**, 292 (1941).
- BADINAND, A., R. MALLEIN u. J. COTTE: Isolament à partir du placenta humain d'une substance à activité adrenocorticotrope. C. R. Soc. Biol. (Paris) **147**, 323 (1953).
- BICKENBACH, W.: Das gonadotrope Hormon in der Placenta. Arch. Gynäk. **172**, 152 (1941).
- Ein weiterer Hinweis auf die plazentare Herkunft der gonadotropen Wirkstoffe in der Schwangerschaft. Klin. Wschr. **20**, 1236 (1941).
- Physiologie der Placenta. In SEITZ-AMREICH, Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. VII, S. 219. Berlin-Innsbruck-München-Wien: Urban & Schwarzenberg 1952.
- BLUMENTHAL, H. T.: Zit. nach J. CHEYMOL, Über die biologische Auswertung des hypophysären Adrenocorticotropins. Wien. Z. inn. Med. **36**, 329 (1955).
- BÖE, F., u. S. SALVERSEN: Zit. nach J. CHEYMOL, Über die biologische Auswertung des hypophysären Adrenocorticotropins. Wien. Z. inn. Med. **36**, 329 (1955).
- COHEN, H., u. W. KLEINBERG: Zit. nach J. CHEYMOL, Über die biologische Auswertung des hypophysären Adrenocorticotropins. Wien. Z. inn. Med. **36**, 329 (1955).
- CUNNINGHAM, B., and H. H. KUHN: Presence of androgens in placenta. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **48**, 314 (1941).
- DICZFALUSY, E.: Progesterone in human placental tissue. I. Separation and determination of progesterone. Acta endocr. (Kbh.) **10**, 373 (1952).
- Chorionic gonadotrophin and oestrogens in the human placenta. Acta endocr. (Kbh.) **12**, Suppl., 41 (1953).
- Das Verhalten von HCG und Oestrogenen in der menschlichen Placenta. 3. Symposium der Dtsch. Ges. für Endokrinologie, Bonn 4. u. 5. 3. 1955. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- ELERT, R.: Nebenniere und Schwangerschaft. Klin. Wschr. **19**, 49 (1940).
- FELLNER, O. O.: Experimentell erzeugte Wachstumsverdrng. am weiblichen Genitale des Kaninchen. Zbl. allg. Path. path. Anat. **23**, 673 (1912).
- Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Gewebsextrakten aus der Placenta und den weiblichen Sexualorganen auf das Genitale. Arch. Gynäk. **100**, 641 (1913).
- FELS, E.: Die Sexualhormone im Blute. Arch. Gynäk. **130**, 606 (1927).
- Über die Bildungsstätten des weiblichen Sexualhormons und des sog. Hypophysenvorderlappenhormons. Zbl. Gynäke. **54**, 2191 (1930).
- Die menschliche Placenta als innersekretorisches Organ. Ber. Gynäk. **22**, 465 (1932).
- GRAF, H., u. H. J. HENNING: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.
- GRANIRER, L. W.: ACTH and cortical steroids in postpartum plasma. J. Amer. med. Ass. **146**, 995 (1951).
- GUGGISBERG, H.: Normale und pathologische Physiologie der Placenta. Ber. Gynäk. **9**, 625 (1926).
- HALBAN, J.: Die innere Sekretion von Ovarium und Placenta und ihre Bedeutung für die Funktion der Milchdrüse. Arch. Gynäk. **75**, 353 (1905).
- HIROSE, A.: Zit. nach E. PHILIPP, Biologie und Pathologie des Weibes, von SEITZ-AMREICH, Bd. I, S. 375. Berlin-Innsbruck-München-Wien: Urban & Schwarzenberg 1953.

- JAILER, J. W., u. A. J. KNOWLTON: Simulated adreno-cortical activity during pregnancy in an Addisonian patient. *J. clin. Invest.* **29**, 1430 (1950).
- JORES, A.: Wechselbeziehungen zwischen mütterlichem und fetalem Endokrinium. 3. Symposium der Dtsch. Ges. für Endokrinologie, S. 112, herausgeg. von H. NOWAKOWSKI. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- KAUFMANN, C., u. J. ZANDER: Progesteron und Chorionepitheliom. *Acta endocr. (Kbh.)* **17**, 216 (1954).
- — Progesteron in menschlichem Blut und Gewebe. II. Mitt. Progesteron im Fettgewebe. *Klin. Wschr.* **34**, 7 (1956).
- KOLLER, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse. In HOPPE-SEYLER-THIERFELDERS Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II, Teil II. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- Statistische Auswertungsmethoden. In H. M. RAUBEN, Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- LABHART, A.: Klinik der inneren Sekretion, S. 595. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- LAHM, W.: M. HIRSCHS Handbuch der inneren Sekretion, Bd. 2, S. 707. Leipzig: C. Kabitzsch 1929.
- LAX, H.: Die Bedeutung der Placentahormone für die Entwicklung und den Verlauf der Toxikose. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **145**, 113 (1956).
- LI, CH. H., H. M. EVANS and M. E. SIMPSON, Adrenocorticotrophic hormone. *J. biol. Chem.* **149**, 413 (1943).
- LLOYD, C. W., E. C. HUGHES, J. LOBOTSKY, J. RIENZO u. G. M. AVERY: Some hormone studies in normal and toxemic pregnancy. *J. clin. Invest.* **31**, 1056 (1952).
- LUNDIN, P. M., u. S. HOLMDAHL: Corticotropic activity of human placenta. *Acta endocr. (Kbh.)* **26**, 388 (1957).
- MAJNARICH, J. J., and R. N. DILLON: Chromatic evidence for a new corticoid in placental extracts. *Arch. Biochem.* **49**, 247 (1954).
- MAYER, A.: Biologie der Placenta. I. Physiologischer Teil. *Arch. Gynäk.* **137**, 1 (1929).
- MITTENECKER, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten. Wien: Franz Deuticke 1958.
- MURATA u. ADACHI: Zit. nach E. PHILIPP. In SEITZ-AMREICH, Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. I, S. 375. Berlin-Innsbruck-München-Wien: Urban & Schwarzenberg 1953.
- OPSAHL, J. C., C. N. H. LONG and E. G. FRY: Chorionic gonadotrophin, ACTH and the adrenal-hyaluronidase relationship. *Yale J. Biol. Med.* **23**, 399 (1951).
- PHILIPP, E.: Ein Beitrag zur hormonalen Wirkung der Placenta auf die Brustdrüse. *Zbl. Gynäk.* **48**, 2527 (1924).
- Die hormonale Wirkung der Plazenta. *Dtsch. med. Wschr.* **80**, 243 (1955).
- Die endokrine Funktion der Plazenta und ihre Bedeutung für die Klinik. *Zbl. Gynäk.* **77**, 129—143 (1955).
- REISS, M., H. PEGLAR and Y. M. L. GOLLA: Adrenocorticotrophic activity in urine from pregnant women. *Nature (Lond.)* **157**, 413 (1946).
- RIESS, H.: Über den Nachweis von männlichen Wirkstoffen im Schwangerenurin und in der Plazenta. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **136**, 1 (1952).
- ROE, J. H., u. A. KUETHER: Zit. nach J. CHEYMOL, Über die biologische Auswertung des hypophysären Adrenocorticotropins. *Wien. Z. inn. Med.* **36**, 329 (1955).
- SALHANICK, H. A., M. W. NOALL, M. X. ZARROW and L. T. SAMUELS: The isolation of progesterone from human placentae. *Science* **115**, 708 (1952).

- SAYERS, G., and M. A. SAYERS: Pituitary-adrenal system. *Recent Progr. Hormone Res.* **2**, 81 (1948).
- — Regulation of pituitary adrenocorticotrophic activity during response of rat to acute stress. *Endocrinology* **40**, 265 (1947).
- SAYERS, M. A., and G. SAYERS: Regulation of anterior pituitary activity during stress. *Proc. Amer. Fed. Clin. Res.* **2**, 96 (1945).
- — and L. A. WOODBURY: The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid-depletion method. *Endocrinology* **42**, 379 (1948).
- SEITZ, L.: Biologie der Placenta. (Pathologischer Teil.) *Arch. Gynäk.* **137**, 322 (1929).
- SMITH, P. E.: Die Störungen im Gefolge der Hypophysektomie und ihre Wiederherstellung. *J. Amer. med. Ass.* **88**, 158 (1927).
- STAEMMLER, H.-J.: Grundlagen und vergleichende Untersuchungen über den Haushalt der NNR-Hormone in der Schwangerschaft. *Habil.-Schr. Kiel* 1954.
- STAEMMLER, H.-J.: Untersuchungen über die Regulation des Kortikosteroidhaushaltes in der Schwangerschaft und ihre Störungen. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **145**, 288 (1956).
- STEWART, H. L.: Hormone secretion by human placenta grown in the eyes of rabbits. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **61**, 990 (1951).
- SULMAN, F. G.: Zit. nach F. G. SULMAN, Standardization of ACTH by the chromatophor test. *Acta endocr. (Kbh.)* **11**, 1 (1952).
- , u. F. BERGMANN: ACTH-Aktivität von Placenta-Extrakten. *J. Obstet. Gynrec. Brit. Emp.* **60**, 123 (1953).
- TARANTINO, C.: Sulla presenza di ACTH nella placenta. *Folia endocr. (Pisa)* **5**, 197 (1951).
- TOBIAN jr., L.: Cortical steroid excretion in edema in pregnancy, pre-eclampsia, and essential hypertension. *Clin. endocr.* **9**, 319 (1949).
- VOGT, E.: Über Vitamine in der Placenta und über die Beziehungen zwischen den Vitaminen und dem Placentahormon. *Arch. Gynäk.* **137**, 207 (1929).

Priv.-Doz. Dr. EBERHARD STROBEL, Universitäts-Frauenklinik Erlangen

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. R. DYROFF)

**Zur Frage der adrenocorticotropen Aktivität
von Blasenmolengewebe**

Von

EBERHARD STROBEL

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Unter entsprechenden untersuchungstechnischen Voraussetzungen konnte in reifem, menschlichem Placentagewebe eine adrenocorticotrope Aktivität nachgewiesen werden (STROBEL). In Ergänzung dieser Untersuchungsergebnisse schien es uns interessant, die adrenocorticotrope Aktivität von Blasenmolengewebe zu prüfen. In der Literatur waren diesbezügliche Angaben nicht zu finden.

Die chorialen Zellelemente des Trophoblasten und später die Placenta sind Bildungsstätten gonadotroper Wirkstoffe.

Da mit der Bildung einer Blasenmole ein Wachstum des Chorionepithels einhergeht, war auch im Blasenmolengewebe mit der Bildung von gonadotropen Wirkstoffen zu rechnen.

Den ersten Nachweis vermehrter gonadotroper Wirkstoffbildung bei Blasenmole erbrachte ASCHHEIM im Jahre 1928.

Es hat sich in weiteren Untersuchungen gezeigt, wie mit zunehmender Wucherung des Chorionepithels mengenmäßig die Bildung und Ausscheidung der gonadotropen Wirkstoffe zunimmt (CLAUBERG, RÖSSLER, EHRHARDT, FELS, SIEGMUND, NEUMANN, SCHULTZE-RHONHOF u. a.).

Die quantitativen Hormonanalysen ergaben auffallend schwankende Ergebnisse. Im Durchschnitt wurden bei Blasenmolen im Harn 30000 bis 300000 ME gonadotrope Wirkstoffe pro Liter (ASCHHEIM, EHRHARDT, WAGNER, WINTER u. a.), im Blut 200000—300000 ME (ZONDEK, EHRHARDT u. a.), in der Molenflüssigkeit 5000—600000 ME Gonadotropin (FELS, CRISTEN und PURGE, WINTER) gefunden, und 4—10 mg Blasenmolengewebe gab eine positive Aschheim-Zondek-Reaktion im Vergleich zu 20—30 mg Placentagewebe (ZONDEK, EHRHARDT, PHILIPP, FELS, NEUMANN u. a.).

Nach Untersuchungen von ASCHHEIM, RÖSSLER, CLAUBERG, PHILIPP u. a. wird bei Blasenmolen im Harn im Vergleich zur Ausscheidung bei normaler Schwangerschaft ungefähr die zehnfache Menge (30000 bis 300000 ME pro Liter) gonadotroper Wirkstoffe gefunden.

Andere Autoren (WLADIKA, RUCIESKA W. a.) fanden nur 30000 bis 50000 ME im Liter Harn.

Im Hinblick auf gonadotrope Wirkstoffe kann die hormonale Analyse bei der Blasenmole sogar einen negativen Befund ergeben (SCHULTZE-RHONHOFF, PHILIPP).

In der neueren Literatur berichten T'IENT, CH'EN und LIU, HOBSON, RODRIGUEZ und MARQUEZ, LURASCHI und VARDELLI, COLUCCI, SILIOTTI, PROSDOCIMI u. a. über Gonadotropin bei Blasenmolen im Harn, in der Molenflüssigkeit und nach Transplantation von Blasenmolengewebe in die vordere Augenkammer des Kaninchens.

Untersuchungen über andere Hormone im Blasenmolengewebe sind in der Literatur kaum vorhanden. Lediglich DE SNOO und FELS berichten über eine Follikelhormon-Aktivität in der Blasenmolenflüssigkeit.

In der Literatur sind keine Angaben über eine ACTH-Aktivität von Blasenmolengewebe zu finden.

Da andererseits an der ACTH-Aktivität menschlichen Placentagewebes kaum mehr gezweifelt werden kann (JAILER und KNOWLTON, TARANTINO, OPSAHL und LONG, COHEN und KLEINBERG, BADINAND, MALLEIN und COTTE, SULMAN und BERGMANN, LUNDIN und HOLMDAHL, STROBEL u. a.), versuchten wir folgende Fragen zu klären:

1. Ist im Blasenmolengewebe eine ACTH-Aktivität nachweisbar?
2. Welche Relation besteht zwischen Placentagewebe und Blasenmolengewebe im Hinblick auf ihre ACTH-Aktivität?

Die nachfolgenden Untersuchungen entsprechen in der Versuchsanordnung, der chemischen Aufarbeitung des Blasenmolengewebes und der biologischen Auswertung weitgehend denjenigen der Untersuchungen über die ACTH-Aktivität menschlichen Placentagewebes (STROBEL).

Arbeitsmethode

Chemische Aufarbeitung des Blasenmolengewebes

Bei der Aufarbeitung des Blasenmolengewebes gingen wir wie bei der Extraktion von Placentagewebe nach der Methode, wie sie LI, EVANS und SIMPSON für die Isolierung von ACTH aus frischen Schweinehypophysen angaben, vor.

Das Blasenmolengewebe wurde unmittelbar post operationem kurz unter fließendem Wasser von anhaftenden Blutresten gereinigt und durch vorsichtiges Abtupfen mit Filterpapier getrocknet.

Von den insgesamt 750 g Molengewebe verwendeten wir zunächst 200 g für die sofortige chemische Aufarbeitung, während die restlichen 550 g tiefgekühlt (unter -15°C) gelagert wurden.

200 g Blasenmolengewebe wurden grob zerkleinert, in 100 ml destilliertem Wasser mit dem Ultra-Turrex unter Kühlung homogenisiert, unter Rühren eine Mischung von 200 ml 36,4%iger Salzsäure und 600 ml Aceton hinzugefügt und die Aufschwemmung 1 Std bei Zimmertemperatur gerührt.

Anschließend zentrifugierten wir die Aufschwemmung 30 min bei 3000 U/min zwischen -8° und -10° C in der Kühlzentrifuge, filtrierten die überstehende Flüssigkeit und zentrifugierten (1 Std bei 3000 U/min) den Rückstand nach Auswaschung mit Aceton-Salzsäure erneut in der Kühlzentrifuge. Die überstehende, klare, bernsteinfarbene Flüssigkeit wurde wiederum filtriert und der feste, grau-braune Rückstand verworfen.

Zu dem gewonnenen Filtrat gaben wir zur Ausfllung 3,2 Liter Aceton und kühlten die Lösung 12 Std unter -5° C. Schließlich konnte die ausgefllte Substanz abgenutscht, mit vorgekühltem Aceton ausgewaschen und im Vakuum getrocknet werden.

Unter dreimaliger Anwendung dieses Verfahrens mit je 200 g Blasenmolengewebe erreichten wir die aus der nachfolgenden Aufstellung hervorgehende, quantitative Ausbeute an einer weiß bis grau gefärbten Trockensubstanz:

Blasenmolensubstanz	Frischgewicht g	Trockensubstanz g	Trockensubstanz pro 100 g Frischgewicht g
A	200	1,7826	0,8913
B	200	1,3345	0,6673
C	200	1,4817	0,7409
			Mittelwert 0,7665

Biologische Auswertung

Die nach der oben angegebenen Methode gewonnenen Trockensubstanzen prüften wir mit Hilfe des Sayers-Testes auf ihre ACTH-Aktivität.

Tabelle 1. *Ascorbinsäureabfall in Dosisabhängigkeit nach Verabreichung von Blasenmolensubstanz (27 Ratten)*

Blasenmolensubstanz mg	Ascorbinsäureabfall				Mittelwert
A	2,5	27	25,5	17,5	22,67
	5,0	54,5	71,5	70	65,33
	10,0	116	101	120,5	112,5
B	2,5	31	11	28	23,33
	5,0	56	89	77	74
	10,0	109	118	140	122,33
C	2,5	15	20	22	19
	5,0	73	65	69	69
	10,0	120	117	114	117

Jede der 3 Substanzen wurde an 9 Ratten getestet. Dabei verabreichten wir in einer Versuchsreihe je 3 Ratten eine Dosis von 2,5 mg (D_1), 5,0 mg (D_2) und 10,0 mg (D_3) in je 0,5 ml destilliertem Wasser gelöste Trockensubstanz intravenös.

Die Tabelle 1 zeigt den Ascorbinsäureabfall in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis.

Statistische Bearbeitung der Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung der bei den Versuchen mit Blasenmolengewebe ermittelten Ergebnisse war von vornherein zu erwarten, daß sich keine Unterschiede der Ascorbinsureabnahme zwischen

den drei verschiedenen Ansätzen A, B und C ergeben. Es war daher zu prüfen, ob die sog. „Nullhypothese“ bestätigt werden kann.

Die Bearbeitung erfolgte nach demselben Schema wie bei den Placentaextrakten. Das Ergebnis der Berechnung ist in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 2. *Streuungszerlegung des Gesamtmaterials*

	<i>SAQ</i>	<i>f</i>	<i>MAQ</i>	<i>F</i>	Statistische Sicherheit %
Regressionsgerade . . .	40945,6	1			
Abweichungen von der Regressionsgeraden .	0,2	1			
Zwischen den Dosen . .	40945,8	2	20477,9	203,6	≥ 99,9
Zwischen den Behand- lungsarten	190,7	2	89,79	0,893	≤ 95
Wechselwirkung D × B	105,8	4	29,23	0,219	≤ 95
Rest innerhalb	1814,2	18	100,57		
Gesamt	43056,5	26			

Tabelle 3. *Berechnung der Regressionsgeraden*

Blasen- molen- extrakt	S_{yy}	b	$b \cdot S_{xy}$	Σd^2	L
A	12378,3	44,58	11926	452,3	13,4
B	16003,6	49,5	14701,5	1302,1	2,8
C	14484	49,0	14406	78,0	2,0
Summe	42865,9		41033,5	1832,4	18,2
Gesamt	43056,5	47,7	40945,6	2110,9	0,2
Rest	190,6		87,9	278,5	18,0

Tabelle 4. *Streuungszerlegung für die Parallelität der Regressionsgeraden*

	Σd^2	<i>f</i>	<i>MAQ</i>	<i>F</i>	Statistische Sicherheit %
Abweichungen von der Parallelität der Regressionsgeraden	278,5	3	92,8	1,06	≤ 95
Zurückzuführen auf:					
Abweichungen zwischen Behand- lungsarten	190,6	2	95,3	1,09	≤ 95
Abweichung von der mittleren, gemeinsamen Regressionsgeraden	87,9	1	87,9	1,01	≤ 95
Abweichungen aller Einzelgeraden zusammen	1832,4	21	87,26		
Abweichungen von der gemeinsamen Regressionsgeraden	2110,9	24			

Sowohl aus Tabelle 2 wie aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß 1. zwischen den 3 Versuchsansätzen kein Unterschied besteht, und 2. daß eine

Tabelle 5. Übersicht (Blasenmolengewebe)

Blasenmolensextrakt	n	S _{yy}	Gleichung der Regressionsgeraden	Steigung der Regressionsgeraden b	s _b	T	r _{xy}	s _y '	s _{yR}	Mittelwert $M \pm s_{yR}$
Gruppe A	9	12378,3		44,58	$\pm 3,28$	13,6	0,98134	$\pm 7,6$	$\pm 2,7$	$67,1 \pm 2,7$
Gruppe B	9	16003,6		49,5	$\pm 5,58$	8,9	0,95845	$\pm 12,8$	$\pm 4,5$	$73,3 \pm 4,5$
Gruppe C	9	14484		49,0	$\pm 1,36$	36,0	0,99730	$\pm 3,1$	$\pm 1,1$	$68,3 \pm 1,1$
Gesamtmaterial der Blasenmole	27	43056,5	$- 25,85 + 47,7 \times$	47,7	$\pm 2,16$	22,1	0,97520	$\pm 8,3$	$\pm 1,8$	$69,5 \pm 1,8$

mittlere Regressionsgerade mit der Steigung 47,7 aufgestellt werden kann, deren Linearität völlig gesichert ist. Die Gleichung dieser Geraden lautet: $G = -25,58 + 47,69 \times$.

Ergebnisse

Blasenmolengewebe wurde in 3 Versuchen mit je 200 g Frischgewicht nach dem angegebenen Verfahren chemisch aufgearbeitet und an insgesamt 27 Ratten im Sayers-Test auf seine ACTH-Aktivität geprüft.

Unter Anwendung dieser Verfahren war im Blasenmolengewebe eine ACTH-Aktivität nachweisbar (Tabelle 1).

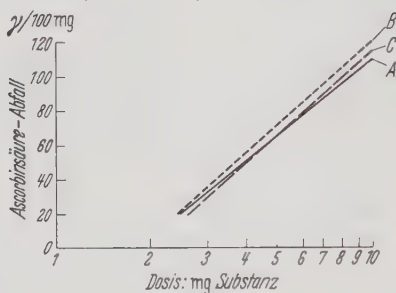


Abb. 1. Blasenmolensextrakte [A—C] (Mittelwerte, 27 Tiere)

Auf Grund der statistischen Bearbeitung der Versuchsergebnisse ist zu ersehen, daß zwischen den 3 Versuchsansätzen kein Unterschied besteht und eine mittlere Regressionsgerade mit der Steigung 47,7 aufgestellt werden kann, deren Linearität völlig gesichert ist (Tabelle 2 und 4, Abb. 1).

Aus 100 g Blasenmolenfrischgewicht wurden durchschnittlich 766,5 mg Trockensubstanz gewonnen.

Wie aus der Übersichtstabelle 5 in Verbindung mit der Eichkurve (s. Arch. Gynäk. 1961, Abb. 1 im Druck) hervorgeht, war bei je 5,0 mg Trockensubstanz der 3 Extrakte A, B und C einer Blasenmole im Mittelwert eine ACTH-Aktivität von 2,1 IE $\pm$ 4,0% (A), 2,2 IE $\pm$ 6,1% (B) und 2,13 IE $\pm$ 1,6% (C) festzustellen.

Auf alle untersuchten Blasenmolenextrakte (A, B und C) bezogen, würde diese im Mittelwert eine Aktivität von $2,15 \text{ IE ACTH} \pm 2,6\%$ pro $5,0 \text{ mg}$ Trockensubstanz ergeben (Tabelle 5).

Unter Berücksichtigung des hohen Flüssigkeitsgehaltes der Blasenmole weisen die Ergebnisse unserer Untersuchungen auf eine relativ hohe ACTH-Aktivität des Blasenmolengewebes gegenüber des reifen Placentagewebes hin [vgl. Arch. Gynäk. **194**, 433 (1961), Abb. 2].

Da Angaben über die quantitative Verteilung zwischen Gewebe und Flüssigkeit bei Blasenmolen in der Literatur noch nicht zur Verfügung stehen, aber, wegen der sehr verschiedenen Blasengröße, auch eine große Schwankungsbreite aufweisen müßten und andererseits die ACTH-Aktivität bisher weder in der Blasenmolenflüssigkeit noch im Blasenmolengewebe geprüft wurde, läßt sich eine Relation zwischen der ACTH-Aktivität der Blasenmole und derjenigen reifen Placentagewebes derzeit zahlenmäßig nicht exakt angeben. Auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse glauben wir jedoch eine im Vergleich zum Placentagewebe relativ hohe ACTH-Aktivität des Blasenmolengewebes annehmen zu dürfen.

Die statistischen Berechnungen wurden nach KOLLER, MITTENECKER, GRAF und HENNING durchgeführt. [Zusammenstellung der bei den statistischen Berechnungen verwendeten Bezeichnungen s. Arch. Gynäk. **194**, 448 (1961)].

Zusammenfassung

Über die adrenocorticotrope Aktivität von Blasenmolengewebe liegen derzeit in der Literatur keine Untersuchungsergebnisse vor. Unter Anwendung des angegebenen Verfahrens ist im Blasenmolengewebe eine ACTH-Aktivität nachzuweisen.

Wie aus der statistischen Bearbeitung der Versuchsergebnisse hervorgeht, besteht zwischen den Ergebnissen der 3 Versuchsansätze des untersuchten Blasenmolengewebes kein Unterschied.

Blasenmolengewebe zeigt im Vergleich zum Placentagewebe eine relativ hohe adrenocorticotrope Aktivität.

Diese Arbeit wurde im November 1959 abgeschlossen.

Literatur

- ASCHHEIM, S.: Über Luteincystenbildung im Ovarium bei Blasenmole und Choriocarcinoma malignum. Die Entstehung dieser Luteincysten durch Wirkung des Hypophysenvorderlappeninkrets. Zbl. Gynäk. **52**, 602 (1928).
BADINAND, A., R. MALLEIN et J. COTTE: Isolament à partir du placenta humain d'une substance à activité adrenocorticotrope. C. R. Soc. Biol. (Paris) **147**, 323 (1953).
CHRISTEA, G., u. G. H. PURGE: Die Blasenmole. Eine Hormonuntersuchung. Gynec. Obstet. **1**, 246 (1936).

- CLAUBERG, C.: Innere Sekretion der Ovarien und Placenta. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1937.
- COHEN, H., u. W. KLEINBERG: Zit. nach J. CHEYMOL, Über die biologische Auswertung des hypophysären Adrenocorticotropins. Wien. Z. inn. Med. **36**, 329 (1955).
- COLUCCI, G., I. SILIOTTI u. W. PRODDOCIMI: Beitrag zum Studium des Hormonhaushaltes bei der Blasenmole und dem Chorionepitheliom. Riv. Obstet. Ginec. (Milano) **34**, 193 (1952).
- EHRHARDT, K.: Diskussionsbemerkung. Dtsch. med. Wschr. **56**, 769 (1930).
- Blasenmole und Schwangerschaftsreaktion. Dtsch. med. Wschr. **56**, 917 (1930).
- Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung von Hypophysen-Vorderlappen-Hormon im Harn. Klin. Wschr. **15**, 514 (1936).
- Biologische (hormonale) Diagnosen aus dem Harn. Münch. med. Wschr. **83**, 6 (1936).
- FELS, E.: Die Sexualhormone im Blute. Arch. Gynäk. **130**, 606 (1927).
- Über die Bildungsstätten des weiblichen Sexualhormons und des sog. Hypophysenvorderlappenhormons. Zbl. Gynäk. **54**, 2191 (1930).
- Die menschliche Placenta als innersekretorisches Organ. Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. **22**, 465 (1932).
- GRAF, H., u. H. J. HENNING: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.
- HOBSON, B. M.: Weitere Beobachtungen über die Ausscheidung von Choriongonadotropin bei Frauen mit Blasenmole. J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp. **65**, 253 (1958).
- JAILER, J. W., and A. J. KNOWLTON: Simulated adreno-cortical activity during pregnancy in an Addisonian patient. J. clin. Invest. **29**, 1430 (1950).
- KOLLER, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse. In HOPPE-SEYLER-THERFELDERS Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II, II. Teil. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- Statistische Auswertungsmethoden. In H. M. RAUBEN, Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- LI, CH. H., H. M. EVANS and M. E. SIMPSON: Adrenocorticotropic hormone. J. biol. Chem. **149**, 413 (1943).
- LUNDIN, P. M., and S. HOLMDAHL: Corticotropic activity of human placenta. Acta endocr. (Kbh.) **26**, 388 (1957).
- LURASCHI, C., u. I. VANDELLI: Befunde bei Transplantation von Blasenmolengewebe in die vordere Augenkammer des Kaninchens. Amer. J. Obstet. Gynec. **78**, 331 (1956).
- MITTENECKER, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten. Wien: Franz Deuticke 1958.
- NEUMANN, H. O.: Chorionepitheliom und AZ-Schwangerschaftsreaktion. Arch. Gynäk. **144**, 448 (1931).
- Klinische und anatomisch-pathologische Studien zum Nebennierenrindenproblem. Arch. Gynäk. **162**, 289 (1936).
- OPSAHL, J. C., u. C. N. H. LONG: Feststellung von ACTH in menschlichem Placenta-Gewebe. Yale J. Biol. Med. **24**, 199 (1951).
- PHILIPP, E.: Die hormonale Wirkung der Placenta. Dtsch. med. Wschr. **80**, 243 (1955).
- Die endokrine Funktion der Placenta und ihre Bedeutung für die Klinik. Zbl. Gynäk. **77**, 129—143 (1955).
- Die inkretorische Funktion der Placenta und ihre Wirkung auf den mütterlichen und fetalen Organismus. In H. NOWAKOWSKI, 3. Symp. der Dtsch. Ges. für Endokrinologie, 4. u. 5. März 1955. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

- RODRIGUEZ, J. A., u. M. MÁRQUEZ: Bestimmung der Gonadotropine in der Blasenmolenzflüssigkeit sowie im Urin vor und nach der Molenausräumung. *Tokoginec. pract.* **16**, 240 (1957).
- RÖSSLER, H.: Über die diagnostische Bedeutung des HVL-Hormons im Urin in Fällen von Blasenmole und Chorionepitheliom. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **96**, 516 (1929).
- RUZICKA, J.: Chorionepitheliom und Mola hydatidosa aus dem Gesichtspunkte der quantitativen Hormonbestimmung. *Arch. Gynäk.* **160**, 76 (1935).
- SAYERS, G., u. M. A. SAYERS: Pituitary-adrenal system. *Recent Progr. Hormone Res.* **2**, 81 (1948).
- SCHULTZE-RHONHOF, F.: Erfahrungen mit der AZ-Reaktion, besonders bei Blasenmole und Chorionepitheliom. *Zbl. Gynäk.* **54**, 578 (1930).
- SIEGMUND, H.: Zum biologischen Nachweis retinierten Chorionepithels, der Mole und des Chorionepithelioms aus dem Harn. *Wien. klin. Wschr.* **44**, 1045 (1931).
- SNOO, K. DE: Chorionepitheliom der Tube. Hormonbildung vom isolierten Trophoblasten. *Zbl. Gynäk.* **52**, 2703 (1928).
- STROBEL, E.: Untersuchungen über die adrenocorticotrope Wirksamkeit menschlichen Placenta-Gewebes. *Arch. Gynäk.* (1961 im Druck).
- SULMAN, F. G., u. F. BERGMANN: ACTH-Aktivität von Placenta-Extrakten. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.* **60**, 123 (1953).
- TARANTINO, C.: Sulla presenza di ACTH nella placenta. *Folia endocr. (Pisa)* **5**, 197 (1951).
- T'EN, S. P., M. P. CH'EN u. T. L. LIU: Über 128 Fälle von Blasenmole. *Chin. med. J.* **74**, 258 (1956).
- WAGNER, G. A.: Diskussionsbemerkung. *Zbl. Gynäk.* **53**, 1332 (1929).
- WINTER, E. W.: Blasenmole und Hormonhaushalt. *Arch. Gynäk.* **155**, 264 (1934).
- WLADIK, W.: Die Aschheim-Zondeksche Schwangerschaftsreaktion bei pathologischen Schwangerschaften. *Zbl. Gynäk.* **55**, 143 (1931).
- ZONDEK, B.: Hormone des Ovariums und des HVL. Wien: Springer 1935.

Priv.-Doz. Dr. E. STROBEL, Universitäts-Frauenklinik, Erlangen

Nicht einzeln im Buchhandel käuflich

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie“

157. Band, 2. Heft, Seite 142—152. 1961

Herausgegeben von

Prof. Dr. E. Philipp in Kiel und Prof. Dr. H. Huber in Marburg/L.

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

Aus der Univ.-Frauenklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. R. D y r o f f)

Untersuchungen über die adrenokortikotrope Aktivität von Nabelschnur- und Retroplazentarblut

Von **Eberhard Strobel**

Mit 3 Abbildungen und 9 Tabellen

In den vergangenen Jahren wurde wiederholt versucht, eine adrenokortikotrop wirksame Substanz im Blut nachzuweisen (Bornstein und Trehwella, Montanari und Parrott, Rossi und Mitarb., Ceresa und Reyneri, Sydnor und Sayers u.a.).

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse sind sehr uneinheitlich. Während einzelne Autoren (Bornstein, Gray und Parrott, Paris, Upson, Sprague, Salassa und Albert u.a.) keine ACTH-Aktivität im Blut nachweisen konnten, werden in anderen Arbeiten (Montanari und Mitarb., Rossi und Mitarb., Cooke, Graetzer und Reiss, Bornstein und Trehwella, Parrott u.a.) Werte von etwa 50—200 m.u. (milliunits) ACTH-Aktivität pro 100 ml Blut oder Plasma angegeben.

Diese unterschiedlichen Resultate dürften unter anderem auf den Verlust von ACTH-Aktivität während der Aufarbeitung des Blutes, auf die Instabilität von ACTH im Blut oder Plasma, auf nicht spezifische Versuchsmethoden und auf die Versuchstechnik zurückzuführen sein (Sydnor, Sayers, Brown und Tyler u.a.).

Die bisher vorliegenden Untersuchungen über die ACTH-Aktivität des Blutes wurden am gesunden Menschen (Sydnor, Sayers und Mitarb., Fujita, Sydnor, Kelley, Raile, Ely und Sayers u.a.), bei Addison- (Sydnor, Sayers und Mitarb.) und Cushing-Kranken (Bornstein und Trehwella u.a.) sowie an Ratten (Sydnor und Sayers) durchgeführt.

Zur chemischen Aufarbeitung des Blutes oder Plasmas kamen in den oben erwähnten Arbeiten vor allem die Methoden von Cooke und Mitarb., Lyons, Astwood und Mitarb. und von Fujita oder deren Modifikationen zur Anwendung.

Obwohl an einer ACTH-Aktivität des menschlichen Plazentagewebes kaum mehr gezweifelt werden kann (Jailer und Knowlton, Tarantino, Opsahl und Long, Cohen und Kleinberg, Badianand, Mallein und Cotte, Sulman und Bergmann, Lun-

din und Holmdahl, Strobel u.a.), ist derzeit noch nicht bekannt, inwieweit diese Aktivität auf einer ACTH-Speicherung in der Plazenta oder auf einer plazentaren Eigenproduktion adrenokortikotrop wirksamer Substanzen beruht. Die Untersuchungsergebnisse an Blasenmolengewebe deuten sehr auf eine chorale Eigenproduktion ACTH-aktiver Substanzen hin (Strobel).

Wir versuchten, der Klärung dieser Frage durch Untersuchungen über die ACTH-Aktivität von Nabelschnur- und Retroplazentarblut näher zu kommen.

Angaben über eine ACTH-Aktivität von Nabelschnurblut waren in der Literatur nicht zu finden.

Sulman und Bergmann berichteten über einen 3- bis 12mal höheren Gehalt des sogenannten ACTH-C-Faktors (Chromatophorotropic factor) in Plazentaextrakten als im Retroplazentarblut des gleichen Patienten. Bei diesen Untersuchungen wurde die Aktivität nach der Methode von Sulman am Frosch (*Hyla arborea*) getestet und in Froscheinheiten angegeben, während wir bei unseren Versuchen die ACTH-Aktivität mit Hilfe des Sayers-Testes prüften.

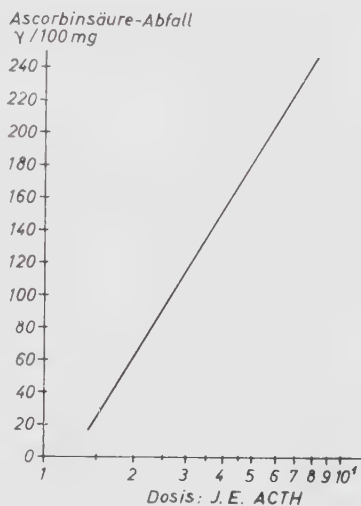


Abb. 1. Eichkurve

Im einzelnen versuchten wir, folgende Fragen zu klären:

1. Kann im Nabelschnurblut eine ACTH-Aktivität nachgewiesen werden?
2. Findet sich im Retroplazentarblut eine meßbare ACTH-Aktivität?
3. Welche Relation besteht zwischen der ACTH-Aktivität des Nabelschnur- und Retroplazentarblutes?

Für die Auswertung der nachfolgenden Versuchsergebnisse war zunächst die Aufstellung einer Eichkurve (s. Abb. 1) erforderlich. (Methode und statistische Bearbeitung: Arch. Gynäk. 1961, Bd. 194, S. 433.)

Arbeitsmethoden

Chemische Aufarbeitung des Nabelschnurblutes

Bei der Aufarbeitung des Nabelschnurblutes gingen wir im wesentlichen nach der von Fujita modifizierten Methode von Astwood und Mitarb. vor.

Unmittelbar nach der Geburt wurden 100 ml Blut aus der Nabelschnur in einem mit 2 ml Heparin versetzten Glaszylinder aufgefangen, unter Rühren 30 ml Eisessig

und 450 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und die Mischung bei einer konstanten Temperatur von 70°C 30 Minuten im Wasserbad weitergerührt.

Abweichend von den Methoden nach Fujita und Astwood versetzten wir die Aufschwemmung anschließend mit 10 g Hyflo-Superell¹⁾, rührten 30 Minuten bei Zimmertemperatur und zentrifugierten 1 Stunde bei 3000 U/min. Diese Modifikation, die vor allem einer weitgehenden Klärung der Aufschwemmung diente, hat sich uns besonders im Hinblick auf die später durchzuführende Filtration bewährt.

Die dunkelbraune, überstehende Flüssigkeit wurde von dem sirupösen Rückstand sorgfältig abgegossen, mit Eisessig oder destilliertem Wasser auf einen p_{H} -Wert von 3,3 gebracht und mit 1 g vorbehandelter²⁾ Oxyzellulose versetzt. Nach 6stündigem Rühren bei Zimmertemperatur filtrierten wir durch ein Glasfilter (G 2), und der Rückstand wurde dann mit 0,1 n Essigsäure so lange sorgfältig ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos war.

Die Eluation erfolgte auf einer Glassäule (7 mm Ø), an deren unterem Ende eine Glasfritte (G 3) eingeschmolzen war. Zunächst wurde mit 5 ml dest. Wasser, dann mit 2 ml 0,1 n Salzsäure und schließlich nochmals mit 5 ml dest. Wasser eluiert.

Alle Fraktionen mit p_{H} 2 oder weniger wurden gesammelt. In der Regel konnten auf diese Weise 4 ml Eluat in 1 Stunde gewonnen werden.

Biologische Auswertung

Das nach der oben angegebenen Methode gewonnene Eluat aus Nabelschnurblut wurde mit Hilfe des Sayers-Testes auf seine ACTH-Aktivität untersucht. Die Ascorbinsäurebestimmung in den Nebennieren hypophysektomierter Ratten erfolgte nach der Methode von Roe und Kuether.

Zur biologischen Auswertung waren für jeden Versuch 10—12 Ratten erforderlich. Den Versuchstieren wurde das Eluat in 3 verschiedenen Dosierungen verabreicht. Bei einer Gesamtmenge der applizierten Flüssigkeit von 0,5 ml enthielt nach der mit destilliertem Wasser angesetzten Verdünnungsreihe die 1. Dosis 0,5 ml, die 2. Dosis 0,25 ml und die 3. Dosis 0,125 ml des Eluates.

Mit dieser Methode wurde in 5 verschiedenen Fällen Nabelschnurblut-Eluat auf seine ACTH-Aktivität an 45 Ratten getestet. Einschließlich der 10 mit einem ACTH-Standard-Präparat und destilliertem Wasser behandelten Kontrolltiere waren für diese Versuchsreihen insgesamt 55 Ratten erforderlich.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abb. 2 und in der Tab. 1 aufgetragen.

In weiteren Versuchen untersuchten wir Retroplazentarblut auf seine ACTH-Aktivität.

¹⁾ Carl Roth, Karlsruhe.

²⁾ Die Oxyzellulose wurde mit 0,1 n Essigsäure, dest. Wasser, 0,1 n Salzsäure, dest. Wasser und 0,1 n Essigsäure vorbehandelt.

Tabelle 1. Dosisabhängigkeit des Ascorbinsäureabfalls nach Injektion von 5 verschiedenen Nabelschnurblut-Eluaten bei 45 Versuchstieren

Eluat aus Nabelschnurblut			Ascorbinsäure-Abfall			Mittelwert
I.	0,5 ml		120	130	140	130
	0,25 ml		59	67	54	60
	0,125 ml		0	0	0	0
II.	0,5 ml		121	131	129	127
	0,25 ml		65	72	55	64
	0,125 ml		0	4	0	1,33
III.	0,5 ml		118	132	134	128
	0,25 ml		58	71	66	65
	0,125 ml		0	2	0	0,66
IV.	0,5 ml		109	100	106	105
	0,25 ml		45	55	56	52
	0,125 ml		1	0	0	0,33
V.	0,5 ml		120	118	92	110
	0,25 ml		57	58	50	55
	0,125 ml		0	7	0	2,33

Chemische Aufarbeitung des Retroplazentarblutes

Auch die Aufarbeitung des Retroplazentarblutes erfolgte in Anlehnung an die von Fujita modifizierte Methode von Astwood und Mitarb. (Oxyzellulose-Methode).

Sofort nach der Geburt des Kindes bzw. der Plazenta wurden 200 ml Retroplazentarblut in einem Glaszylinder mit 2 ml Heparin aufgefangen, unter Rühren 60 ml Eisessig und 900 ml dest. Wasser hinzugefügt und die Mischung bei einer konstanten Temperatur von 70°C 30 Minuten im Wasserbad gerührt.

Nach Zugabe von 20 g Hyflo-Supercell rührten wir die Aufschwemmung 30 Minuten bei Zimmertemperatur und zentrifugierten 1 Stunde bei 3500 U/min.

Die Aufarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie beim Nabelschnurblut (S. 143).

Biologische Auswertung

Das mit der oben angegebenen Methode gewonnene Eluat aus Retroplazentarblut wurde durch Bestimmung des Ascorbinsäureabfalls in den Nebennieren hypophysektomierter Ratten (Sayers-Test) auf seine ACTH-Aktivität untersucht.

10—12 Ratten einer Versuchsreihe erhielten das Eluat in 3 verschiedenen Dosierungen (0,5 ml, 0,25 ml und 0,125 ml) intravenös verabreicht

Die gesamte, applizierte Flüssigkeitsmenge einschließlich des zur Verdünnung verwendeten destillierten Wassers betrug 0,5 ml pro Tier.

Mit dieser Technik wurde Retroplazentarblut-Eluat von 5 Kreißenden an 45 Ratten getestet. Zusätzlich verabreichten wir 10 Versuchstieren ein ACTH-Standard-Präparat bzw. destilliertes Wasser zur Kontrolle.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abb. 3 und in der Tab. 2 aufgetragen.

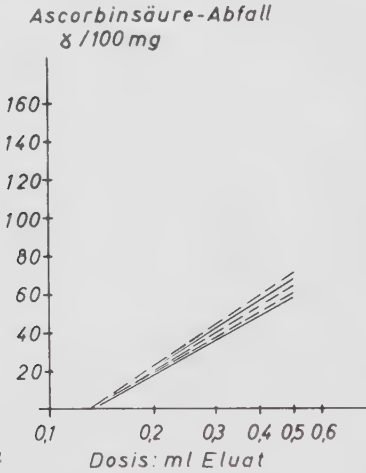


Abb. 2

Abb. 2. Nabelschnurblut-Eluate (5 Versuche, 45 Tiere)

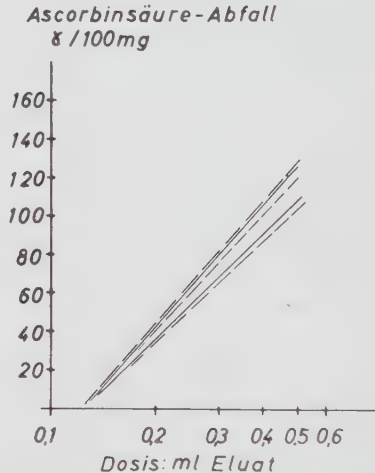


Abb. 3

Abb. 3. Retroplazentarblut-Eluate (5 Versuche, 45 Tiere)

Tabelle 2. Dosisabhängigkeit des Ascorbinsäureabfalls nach Injektion von 5 verschiedenen Retroplazentarblut-Eluaten bei 45 Versuchstieren

Eluat aus Retroplazentarblut		Ascorbinsäure-Abfall			Mittelwert
I.	0,5 ml	60	62	77,5	66,5
	0,25 ml	37	34	28	33
	0,125 ml	0	0	0	0
II.	0,5 ml	57	68	58	61
	0,25 ml	32	32	26	30
	0,125 ml	0	0	0	0
III.	0,5 ml	61	69	80	70
	0,25 ml	28	39	38	35
	0,125 ml	0	0	0	0
IV.	0,5 ml	80	64	75	73
	0,25 ml	49	37	25	37
	0,125 ml	0	0	0	0
V.	0,5 ml	55	60	71	62
	0,25 ml	30,5	34	27	30,5
	0,125 ml	0	0	0	0

Tabelle 3. Streuungszerlegung (Nabelschnurblut-Eluate)

	SAQ	f	MAQ	F	Statistische Sicherheit
Regressionsgerade	106 325,9	1			
Abweichungen v. d. Regressionsgeraden	16,9	1			
Zwischen den Dosen	106 342,6	2	53 171,3	112,75	$\geq 99,9\%$
Zwischen den Behandlungsarten	1 113,0	4	278,3	5,90	99—99,9 %
Wechselwirkung D $\times$ B	891,6	8	111,4	2,36	$> 95\%$
Rest innerhalb	1 414,7	30	47,16		
Gesamt	109 761,9	44			

Tabelle 4. Berechnung der Regressionsgeraden

Nabelschnurblut-Eluat	S_{yy}	S_{xy}	b	S_{yR}	$\sum d^2$	L
A	25 686	390	65,0	25 350	336,	50
B	23 900,9	377	62,8	23 688,2	212,7	0,1
C	24 562,2	382	63,6	24 320,7	241,5	0,8
D	16 550,2	314	52,3	16 432,7	117,5	0,8
E	17 949,6	323	53,8	17 388,2	561,4	2,7
Summe	108 648,9			107 179,8	1469,1	54,3
Gesamt	109 761,9	1 786	60,04	106 325,9	3436,0	16,9
Rest	1 113,0			853,9	1966,9	37,4

Tabelle 5. Streuungszerlegung für die Parallelität der Regressionsgeraden

	$\sum d^2$	f	MAQ	F	Statistische Sicherheit
Abweichungen v. d. Parallelität der Regressionsgeraden	1 966,9	7	281	6,70	$> 99,9\%$
Zurückzuführen auf: Abweichungen zwischen Behandlungsarten	1 113,0	4	278,2	6,63	$> 99,9\%$
Abweichung v. d. mittleren, gemeinsamen Regressionsgeraden	853,9	3	284,6	6,78	rd. 99,9 %
Abweichungen aller Einzelgeraden zusammen	1 469,1	35	41,97		
Abweichungen v. d. gemeinsamen Regressionsgeraden	3 436,0	42			

Tabelle 6. Übersicht (Nabelschnurblut-Eluate)

Nabelschnurblut-Eluat	S_{yy}	Gleichung d. Regressionsgeraden	Steigung der Regressionsgeraden b	s_b	T	r_{xy}	s_y^2	s_{yR}	Mittelwert $M \pm s_{yR}$
A	25 686	— 66,7 + 65 x	65,0	2,83	23,0	0,9934	± 6,5	2,31	63,3 ± 2,31
B	23 900,9	— 61,6 + 62,8 x	62,8	2,25	27,9	0,9955	± 5,2	1,84	64,1 ± 1,84
C	24 562,2	— 62,8 + 63,7 x	63,7	2,4	26,6	0,9951	± 5,5	1,96	64,6 ± 1,96
D	16 550,2	— 52,2 + 52,3 x	52,3	1,67	31,4	0,9966	± 3,8	1,36	52,4 ± 1,36
E	17 949,6	— 51,9 + 53,8 x	53,8	3,62	14,8	0,9842	± 8,4	2,95	55,8 ± 2,95
Gesamtmat. der Eluate	109 761,9	— 59,0 + 59,5 x	59,5	± 1,63	36,9	0,9892	± 7,3	± 1,33	59,6 ± 1,33

Statistische Bearbeitung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse bei den Untersuchungen über die ACTH-Aktivität von Nabelschnur- und Retroplazentarblut erfolgte im üblichen Schema der Varianzanalyse, obwohl zunächst Bedenken dagegen erhoben werden könnten, daß in beiden Gruppen (Nabelschnur- und Retroplazentarblut) bei der niedrigsten Dosierung „Null-Werte“ auftreten. Die Angabe „0“ bedeutet jedoch, daß bei dem betreffenden Versuchstier innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode kein Ascorbinsäureabfall festgestellt werden konnte. Die Angabe „0“ bedeutet eine echte Aussage, und es handelt sich im vorliegenden Fall nicht um „unvollständige“ Tabellen, deren statistische Bearbeitung unter Umständen in Frage gestellt ist.

Andererseits kommt aber in solchen Fällen der Kovarianzanalyse, d.h. der Berechnung der SAQ der Regressionsgeraden usw. eine besondere Bedeutung zu, da nur mit ihrer Hilfe entschieden werden kann, ob sich tatsächlich die Versuchsergebnisse in Form von Regressionsgeraden darstellen lassen, was aus der gewöhnlichen Streuungsanalyse nicht zu entnehmen ist.

Im nicht zutreffenden Fall wäre die Zuordnung der Mittelwerte des Ascorbinsäureabfalls der betreffenden Versuchsgruppen zur Eichkurve, d.h. die Ermittlung der ACTH-Aktivitäten der Eluate zum mindesten erschwert, wenn nicht ganz unmöglich.

Für die Nabelschnurblut-Eluate ist aus der Tab. 3 zu ersehen, daß der Unterschied zwischen den „Behandlungen“, d.h. den 5 verschiedenen Eluat, statistisch mit einer Sicherheit zwischen 99% und 99,9% gut gesichert ist, die „Wechselwirkung $D \times B$ “ aber nur wahrscheinlich ist.

Die Tab. 5, in der das Ergebnis der eingehenderen Kovarianzanalyse der Tab. 4 zusammengefaßt ist, zeigt aber, daß 5 Regressionsgeraden aufgestellt werden können, die statistisch gesichert voneinander verschieden sind.

In Tab. 6 sind ebenfalls wieder die verschiedenen, interessierenden Größen für die Ergebnisse der Untersuchungen mit den 5 Nabel-

Tabelle 7. Streuungszerlegung (Retroplazentarblut-Eluate)

	SAQ	f	MAQ	F	Statistische Sicherheit
Regressionsgerade	33 166,9	1			
Abweichungen v. d. Regressionsgeraden	0,2			0,005	
Zwischen den Dosen	33 167,1	2	16 583,6	432,7	$\gg 99,9\%$
Zwischen den Behandlungsarten	261,7	4	65,43	1,71	$\ll 95\%$
Wechselwirkung $D \times B$	158,9	8	19,86	0,52	$\gg 95\%$
Rest innerhalb	1 150,0	30	38,33		
Gesamt	34 737,7	44			

Tabelle 8. Berechnung der Regressionsgeraden

Retroplazentarblut-Eluate	S_{yy}	b	S_{yR}	$\sum d^2$	L
I	6 859,0	33,25	6 633,4	225,6	0,1
II	5 670,0	31,0	5 581,5	88,5	0,5
III	7 606,0	35,0	7 350,0	256,0	0,0
IV	8 416,0	36,5	7 993,5	422,5	0,5
V	5 925,0	31,0	5 766,0	159,0	0,5
Summe	34 476,0		33 324,4	1 151,6	1,6
Gesamt	34 737,7	33,25	33 166,9	1 570,8	0,2
Rest	261,7		157,5	419,2	1,4

schmurlut-Eluaten sowie diejenigen für die gemeinsame mittlere Regressionsgerade zusammengestellt.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen der Untersuchungen mit Nabelschnurblut-Eluat besteht bei den Retroplazentarblut-Eluaten kein Unterschied zwischen den 5 Versuchsansätzen (vgl. Zeile 4 und 5 der Tab. 7). Die mittleren Abweichungsquadrate (MAQ) „zwischen den Behandlungen“ und der „Wechselwirkung“ sind nicht viel größer bzw. sogar kleiner als die Reststreuung (Zeile 6 der Tab. 7).

Die Quotienten $F_1 = \frac{65,43}{38,33} = 1,71$ bzw.

$F_2 = \frac{19,86}{38,33} = 0,52$ dieser beiden Größen sind erheblich kleiner als

F-Werte, die bei den entsprechenden Freiheitsgraden f für die 95proz. Sicherheit erreicht werden müssen (im vorliegenden Fall $F_1 = 2,69$ bzw. $F_2 = 2,27$).

Diese Aussage wird durch die Kovarianzanalyse bestätigt.

In Tab. 9 sind alle F-Werte ebenfalls kleiner als die zugehörigen F-Werte für die 95proz. Sicherheit ($F_1 = 1,82$ anstatt 2,30, $F_2 = 1,99$ anstatt 2,65 und $F_3 = 1,60$ anstatt 2,86).

Tabelle 9. Streuungszerlegung für die Parallelität der Regressionsgeraden

	Σd^2	f	MAQ	F	Statistische Sicherheit
Abweichungen von der Parallelität der Regressionsgeraden.	419,2	7	59,9	1,82	$\ll 95\%$
Zurückzuführen auf: Abweichungen zwischen Behandlungsarten	261,7	4	65,4	1,99	$\ll 95\%$
Abweichungen von der mittleren, gemeinsamen Regressionsgeraden	157,5	3	52,5	1,60	$\ll 95\%$
Abweichungen aller Einzelgeraden zusammen.	1 151,6	35	32,9		
Abweichungen von der gemeinsamen Regressionsgeraden.	1 570,8	42			

Gleichung der Geraden: $-33,3 + 33,25 \times$

Steigung $b = 33,25$

Streuung $s_b = \pm 1,1$

Prüfgröße $T = 30$

Streuung der Einzelwerte $s_y = \pm 28,1$

Korrelationskoeffizient $r_{xy} = 0,97712$

Mittlere Abweichung der Einzelwerte von der Regressionsgeraden

$s_y' = \pm 6,0$

Mittlere Abweichung des Mittelwertes vom Mittelwert der Regressionsgeraden $s_{yR} = \pm 0,9$

Mittelwert: $33,2 \pm 0,9$

Die gemeinsame Regressionskurve für alle Retroplazentarblut-Eluate, deren charakteristische Größen als Anhang an Tab. 9 im einzelnen angegeben sind, verläuft ebenfalls linear. Aus Tab. 7 ist zu entnehmen, daß die Abweichung von der Linearität der Regressionsgeraden mit einem SAQ von 0.2 völlig in der Reststreuung 1150 untergehen (vgl. Zeile 2 und 6 der Tab. 7). Der Quotient F ist 0,005.

Die statistischen Berechnungen wurden nach Koller, Mittenecker, Graf und Henning durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorangehenden statistischen Bearbeitung der Untersuchungen über die ACTH-Aktivität von Nabelschnurblut- und Retroplazentarblut-Eluaten können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Es besteht ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen dem Ascorbinsäureabfall bei den 5 untersuchten Nabelschnurblut-Eluaten.
2. Für die Nabelschnurblut-Eluate läßt sich die Dosisabhängigkeit des Ascorbinsäureabfalls in der Form von 5 Regressionsgeraden darstellen.

3. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Retroplazentarblut-Eluaten zeigen keinen Unterschied zwischen den 5 verschiedenen Versuchsansätzen.
4. Für alle Retroplazentarblut-Euate läßt sich eine gemeinsame Regressionskurve aufstellen, die statistisch gesichert linear verläuft.
5. Die Nabelschnurblut-Euate zeigen im Vergleich zu den Retroplazentarblut-Eluaten eine größere ACTH-Aktivität.

Zusammenstellung der bei den statistischen Berechnungen
verwendeten Bezeichnungen

SAQ	=	Summe der Abweichungsquadrate
S_{xx}	=	$\sum (x-x)^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate x
S_{yy}	=	$\sum (y-y)^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate y
S_{xy}	=	$\sum (x-x)(y-y)$ = Summe der Abweichungsquadrate des Produktes x · y
f	=	Zahl der Freiheitsgrade
MAQ	=	mittleres Abweichungsquadrat
b	=	Steigung der Regressionsgeraden
$n_1 b S_{xy}$	=	$b S_{xy}$ = die SAQ der jeweiligen Regressionsgeraden
L	=	Abweichungen von der Linearität der Regressionsgeraden
$\sum d^2$	=	$S_{yy} - b S_{xy}$ = „Reststreuung“
s_y	=	die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} vom Mittelwert y
S_b	=	Streuung des Regressionskoeffizienten
T	=	Prüfgröße (zur Sicherung des Regressionskoeffizienten)
r_{xy}	=	Korrelationskoeffizient
s_y'	=	die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} von der Regressionsgeraden
s_{yR}	=	die mittlere Abweichung des Mittelwertes vom Mittelwert der Regressionsgeraden
G_R	=	Gleichung der Regressionsgeraden

Zusammenfassung: Die Frage, inwieweit die im menschlichen Plazentagewebe nachgewiesene adrenokortikotrope Aktivität auf einer Speicherung des hypophysär gebildeten, adrenokortikotropen Hormons in der Plazenta oder auf einer placentaren Eigenproduktion adrenokortikotrop wirksamer Substanzen beruht, wurde durch Untersuchungen über die adrenokortikotrope Aktivität von Nabelschnur- und Retroplazentarblut zu klären versucht.

Nach einer eigenen Modifikation der Methode von Fujita wurden in je 5 verschiedenen Fällen Nabelschnur- und Retroplazentarblut chemisch aufgearbeitet und die gewonnenen 10 verschiedenen Euate an insgesamt 90 Ratten mit dem Sayers-Test auf ihre ACTH-Aktivität getestet. Dabei konnte unter den angegebenen Versuchsbedingungen sowohl in den Nabelschnurblut- als auch in den Retroplazentarblut-Eluaten eine adrenokortikotrope Aktivität nachgewiesen werden. Die Nabelschnurblut-Euate zeigten im Vergleich zu den Retroplazentarblut-Eluaten eine größere ACTH-Aktivität.

Investigations of the adrenocorticotropic activity of cord blood and retroplacental blood.

Summary: With studies of the adrenocorticotropic activity of cord blood and retroplacental blood an attempt has been made to clarify the question, whether the adrenocorticotropic activity established in human placental tissue is due to an accu-

mulation of adrenocorticotrophic hormone of hypophyseal origin in the placenta or to a specific placental production of substances with an adrenocorticotrophic effect.

According to a personal modification of the method of Fujita, each cord blood and retroplacental blood were chemically investigated in 5 different cases and the 10 different eluates thus derived were tested for their ACTH — activity by means of the Sayers — test in a total of 90 rats. Hereby an adrenocorticotrophic activity could be established in the cord blood eluates as well as in those of the retroplacental blood under the experimental conditions described. In comparison to the eluates of retroplacental blood the cord blood eluates showed a higher ACTH — activity.

Schrifttum

- Astwood, E. B., Raben, M. S., Payne, R. W., und Grady, A. B.: J. Am. Chem. Soc. 1951, Bd. 73, S. 2969—2970. — Badinand, A., Mallein, R., und Cotte, J.: Compt. rend. Soc. biol., Paris 1953, Bd. 147, S. 323. — Bornstein, J., Gray, C. H., und Parrott, D. M. V.: J. Endocr. 1952, Bd. 8, S. 40. — Bornstein, J., und Trewhella, Ph.: Lancet, London 1950, Bd. 259, S. 678. — Ceresa, F., und Reyneri, C.: Folia endocrinol. 1952, Bd. 5, S. 179. — Cohen, H., und Kleinberg, W.: Lancet 1952, Bd. 2, S. 201. — Cooke, D. S., Graetzer, E., und Reiss, M.: J. Endocr. 1947—1948, Bd. 5. — Fujita, T.: J. Clin. Endocr. (Springf.) 1957, Bd. 17, S. 512. — Graf, H., und Henning, H. J.: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Springer, Berlin — Göttingen — Heidelberg 1953. — Jailer, J. W., und Knowlton, A. J.: J. Clin. Invest. 1950, Bd. 29, S. 1430. — Koller, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, in: Hoppe — Seyler — Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II. II. Teil. Springer, Berlin 1955. — Ders.: Statistische Auswertungsmethoden, in: H. M. Rauben, Biochemisches Taschenbuch. Springer, Berlin 1956. — Lundin, P. M., und Holmdahl, S.: Acta endocr. 1957, Bd. 26, S. 388. — Lyons, W. R.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1937, Bd. 35, S. 645. — Mittenecker, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten. F. Deuticke, Wien 1958. — Montanari, L., Martinelli, M., und Castelli, A.: Boll. Soc. ital. biol. sper. 1956, Bd. 32, S. 1193. — Montanari, L., Martinelli, M., Rossi, C. A., und Moruzzi, G.: J. Am. Med. Ass. 1951, Bd. 147, S. 525. — Opsahl, J. C., und Long, C. H. H.: Yale J. Biol. 1951, Bd. 24, S. 199. — Paris, J., Upson jr., M., Sprague, R. G., Salassa, R. M., und Albert, A.: J. Clin. Endocr. 1954, Bd. 14, S. 597. — Parrott, D. M. V.: J. Endocr. 1951, Bd. 7, S. 1. — Ders.: J. Endocr. 1955, Bd. 12, S. 120. — Roe, J. H., und Kuether, A.: J. Biol. Chem. 1943, Bd. 147, S. 399. — Rossi, C. A., Montanari, L., Martinelli, M., und Moruzzi, G.: J. Am. Med. Ass. 1952, Bd. 149, S. 1242. — Sayers, G., und Sayers, M. A.: Recent Progr. Hormone Res., N.Y. 1948, Bd. 2, S. 81. — Strobel, E.: Arch. Gynäk. 1961, Bd. 194, S. 433. — Ders.: Arch. Gynäk. 1961, Bd. 194, S. 452. — Sulman, F. G.: Nature (London) 1952, Bd. 9, S. 31. — Ders.: Refuah Vet. 1952, Bd. 9, S. 31. — Ders.: Lancet 1952, Bd. 1, S. 1161. — Sulman, F. G., und Bergmann, F.: J. Obstetr. Gynec. Brit. Empire 1953, Bd. 60, S. 123. — Sydnor, K. L., Kelley, V. C., Raile, R. B., Ely, R. S., und Sayers, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 1953, Bd. 82, S. 695. — Sydnor, K. L., und Sayers, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 1952, Bd. 79, S. 432. — Dies.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 1952, Bd. 79, S. 432. — Sydnor, K. L., Sayers, G., Brown, H., und Tyler, F. H.: J. Clin. Endocr. 1953, Bd. 13, S. 891. — Tarantino, C.: Fol. endocr. 1951, Bd. 5, S. 197.

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen

(Direktor: Prof. Dr. R. Dyrhoff)

Zur Frage der ACTH-Aktivität der Placenta und des Feten bei Ratten

Von Eberhard Strobel

Mit 1 Abbildung

In einer Reihe von Untersuchungen [11, 12, 13] versuchten wir zur Klärung der Frage beizutragen, inwieweit die in menschlichem Placentagewebe nachgewiesene adrenocorticotrope Aktivität auf einer placentaren Speicherung des hypophysär gebildeten adrenocorticotropen Hormons oder auf einer Eigenproduktion von Seiten der Placenta beruht.

Bei diesen Untersuchungen konnte in reifem menschlichen Placentagewebe [11], in Blasenmolengewebe [12] und in Nabelschnurblut- und Retroplacentalblut-Eluaten [13] eine verschieden hohe adrenocorticotrope Aktivität nachgewiesen werden.

Dabei zeigten die Extrakte aus Blasenmolengewebe im Vergleich zu denjenigen aus reifem menschlichen Placentagewebe eine relativ hohe adrenocorticotrope Aktivität. Ferner war bei den Nabelschnurblut-Eluaten im Vergleich zu den Retroplacentalblut-Eluaten eine höhere ACTH-Aktivität festzustellen (Abb. 1).

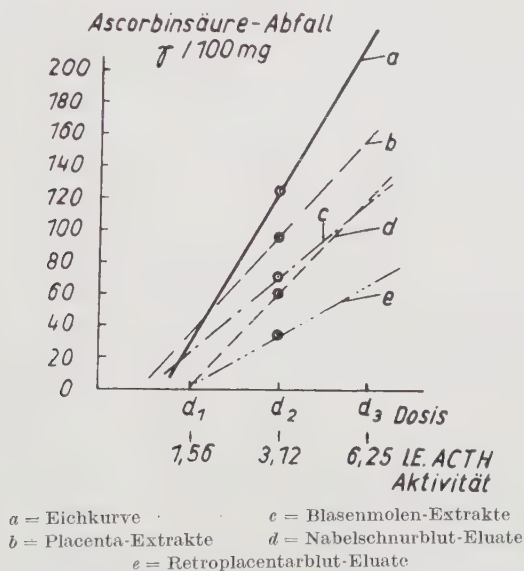


Abb. 1. Vergleich der in Gewebe-Extrakten und Blut-Eluaten ermittelten ACTH-Aktivitäten mit der Eichkurve

Die in den Gewebe-Extrakten und Blut-Eluaten enthaltenen adrenocorticotropen Aktivitäten wurden wie folgt ermittelt. In unserem gesamten, bisher statistisch untersuchten Material einschließlich der Eichkurve trat unter allen zu berechnenden Regressionsgraden als verhältnismäßig größte Abweichung von der Linearität ein AQ-Wert von 50 beim Versuch A der Nabelschnurblut-Eluate auf [11].

Die Streuungszerlegung für diesen Teil ist folgende:

	SAQ	f	MAQ	F
Regressionsgerade.....	25 350	1		
Abweichung von der Linearität ..	50	1		1,05
Zwischen den Dosen	25 400	2	12 700	
Rest	286	6	47,7	
Gesamt	25 686	8		

Im Vergleich mit der Reststreuung (286) ergibt sich für die Abweichungen von der Linearität ein $F = 1,05$. Da bei $n_1 = 1$ und $n_2 = 6$ die 95%-Grenze erreicht ist, wenn $F = 5,99$ beträgt, ist selbst hier zu sagen, daß die Regressionskurve linear verläuft.

Auf Grund der Feststellung, daß sowohl die Eichkurve wie auch die Dosis-abhängigkeit des Ascorbinsäure-Abfalls bei allen Versuchsgruppen im gewählten halblogarithmischen Auswertungssystem zum großen Teil mit einer außerordentlich hohen Sicherheit linear verlaufen, können auch durch Vergleich mit der Eichkurve die ACTH-Aktivitäten ermittelt werden, die in den verschiedenen Versuchsansätzen (Placenta-Extrakt, Blasenmolen-Extrakt, Nabelschnurblut- und Retroplacentalblut-Eluat) enthalten waren.

In der folgenden Tabelle 1 sind die Gleichungen der Regressionsgeraden mit den zugehörigen, errechneten Mittelwerten zusammengestellt, wobei die einfache Streuung in Prozenten des Mittelwertes angegeben ist. Da in diesem Zusammenhang nur die gemeinsamen Mittelwerte interessieren, sind für die Untersuchungen der Gewebsextrakte bzw. Blut-Eluate die mittleren Geraden des jeweiligen Gesamtmaterials aufgetragen. In der letzten Spalte dieser Tabelle wurden die ACTH-Aktivitäten angegeben, die entweder aus der Abb. 1 graphisch abgelesen oder wie folgt berechnet werden können.

Tabelle 1

Gleichungen der Regressionsgeraden mit den zugehörigen, errechneten Mittelwerten und ACTH-Aktivitäten

	Gleichung der Regressionsger.	Mittelwert	ACTH-Aktivität
a) Eichkurve	$y = -66,6 + 94,4 x$	$122,2 \pm 4,3\%$	
b) Placenta-Extrakte....	$y = -29,3 + 62,0 x$	$\bar{y}_b = 94,7 \pm 2,1\%$	$2,54 \pm 2,1\%$
c) Blasenmol.-Extrakte..	$y = -25,9 + 47,7 x$	$\bar{y}_c = 69,5 \pm 2,6\%$	$2,10 \pm 2,6\%$
d) Nabelschn. Blut-Eluate	$y = -59,0 + 59,5 x$	$\bar{y}_d = 60,0 \pm 2,2\%$	$1,97 \pm 2,2\%$
e) Retroplac. Blut-Eluate	$y = -33,3 + 33,25 x$	$\bar{y}_e = 33,2 \pm 3,0\%$	$1,61 \pm 3,0\%$

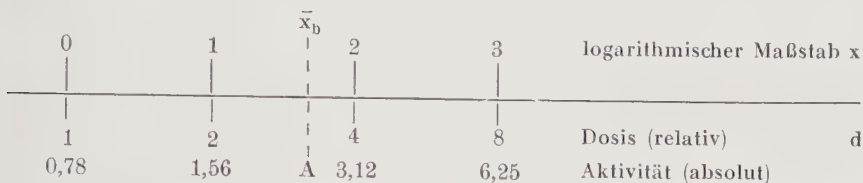
Durch Einsetzen des Mittelwertes $\bar{y}_b$ in die Gleichung (a) erhält man z. B.

$$94,7 = -66,6 + 94,4x$$

und daraus den zugehörigen Mittelwert (im logarithmischen System)

$$\bar{x}_b = \frac{161,3}{94,4} = 1,71.$$

Auf Grund des in der untenstehenden Skizze dargestellten Maßstabverhältnisses der Abszisse



$$\text{gilt } x_1 : \bar{x}_b = \log 2 : \log \bar{d}_b$$

$$\text{d. h. } \log \bar{d}_b = \frac{\bar{x}_b \cdot \log 2}{1} = \frac{1,71 \cdot 0,303}{1} = 0,513$$

wobei $\bar{d}_b$ die Mittelwertdosis im (relativen) Dosismaßstab ist.

Daraus folgt für die zu dem Mittelwert $\bar{y}_b$ gehörende absolute Aktivität.

$$A_b = 0,78 \cdot \bar{d}_b = 0,78 \cdot 3,26 = \underline{2,54},$$

d. h. die untersuchten Placenta-Extrakte besitzen im gemeinsamen Mittel eine Aktivität von $2,54 \pm 2,1\%$ I. E. ACTH.

Bei dieser Streuungsangabe ist jedoch zu bemerken, daß hierbei nur die Streuung des Untersuchungsmaterials ohne Berücksichtigung der Streuung der Eichkurve notiert wurde.

Die eingangs gestellte Frage ließ sich auf Grund der bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig beantworten. Wir versuchten daher, diese Frage durch tierexperimentelle Untersuchungen an der Ratte weiter aufzuklären. Für eine Beurteilung der späteren Untersuchungen an hypophysektomierten Tieren waren zunächst Versuche an nicht operierten Ratten erforderlich, worüber nachfolgend berichtet wird. Dabei sind wir uns bewußt, daß diese Ergebnisse nicht ohne weiteres für die Verhältnisse beim Menschen übernommen werden können.

Wir stellten uns folgende Fragen:

1. Kann in der Ratten-Placenta im Ende der Gravidität eine ACTH-Aktivität nachgewiesen werden?
2. Enthält der Ratten-Fet am Ende der Schwangerschaft eine meßbare ACTH-Aktivität?
3. Welche Relation besteht zwischen der ACTH-Aktivität der Placenta und des Feten bei Ratten am Ende der Gravidität?

Nach Arbeiten von Greer [3] und Gardner und Allen [1] soll die Placenta von Ratten und Mäusen keine ACTH-Aktivität besitzen. Diese

Untersuchungen stützen sich jedoch im wesentlichen auf Gewichtsbestimmungen und histologische Studien der Nebennieren bei hypophysektomierten Tieren. Der Sayers-Test war damals noch nicht bekannt.

Jöchle [4] nimmt auf Grund seiner Untersuchungen an der isolierten Froshhaut eine ACTH-Aktivität der Placenta vom Rind, Pferd, Hund und von der Ziege an.

Versuchsordnung

Auswahl der Tiere:

Es wurden reingezüchtete, weibliche Ratten eines Wistar-Stammes verwendet, um den Forderungen einer weitgehenden Homogenität des Tiermaterials zu entsprechen. Die Versuchstiere waren gleich alt und zeigten ein Gewicht von 160 ± 20 g. Unterbringung, Pflege und Fütterung waren für alle Tiere völlig gleichartig.

Paarung:

Um den Beginn der Gravidität möglichst exakt beurteilen zu können, wurden die Tiere während des Östrus 24 Stunden gepaart und der folgende Tag als erster Tag der Gravidität gerechnet.

Die Beurteilung des Östrus-Stadiums erfolgte durch tägliche Vaginalabstriche mit Hilfe einer Platinöse. Das an der Platinöse anhaftende Zellmaterial wurde auf einem Objektträger ausgestrichen, getrocknet, mit Methylenblau gefärbt und anschließend das Zellbild ausgewertet.

Chemische Aufarbeitung des Gewebes:

Am 20. Tag der Gravidität wurden die schwangeren Ratten mit Äther-Chloroform getötet und die lebendfrischen Placenten und Feten entnommen. von Blut und Fruchtwasser gereinigt und gewogen.

Von insgesamt 22 schwangeren Tieren (durchschnittliche Wurfzahl 7,9) erhielten wir 174 Placenten bzw. Feten mit einem Gesamtgewicht von 79,33 g bzw. 460,03 g.

Bei der chemischen Aufarbeitung der Ratten-Placenten und -Feten gingen wir nach der Methode, wie sie Li, Evans und Simpson [7] für die Isolierung von ACTH aus frischen Schweine-Hypophysen angaben, wie folgt vor: 174 Ratten-Placenten mit einem Gesamtgewicht von 79,33 g wurden grob zerkleinert und in 40 ml destilliertem Wasser mit dem Ultra-Turrax unter Kühlung homogenisiert. Unter Rühren wurde eine Mischung von 80 ml 36,4%iger Salzsäure und 240 ml Aceton hinzugefügt und die Aufschwemmung eine Stunde bei Raumtemperatur weiter gerührt.

Anschließend konnte die Aufschwemmung 30 Minuten bei 3000 U/min. zwischen -8 und -10 °C. zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit filtriert, und der Rückstand nach Auswaschung mit Aceton-Salzsäure erneut zentrifugiert (eine Stunde bei 3000 U/Min.) werden. Die überstehende Flüssigkeit wurde wiederum filtriert und der feste, graubraune Rückstand verworfen.

Zu dem gewonnenen Filtrat wurden zur Ausfällung 1280 ml Aceton hinzugegeben und die Lösung 12 Stunden unter -5 °C. gekühlt.

Schließlich konnte die ausgefällte Substanz abgenutscht, mit 40 ml vorgekühltem Aceton ausgewaschen und im Vakuum getrocknet werden.

Bei Anwendung dieses Verfahrens konnten aus 79,33 g Ratten-Placenta 1.19 mg einer weiß bis grau gefärbten Trockensubstanz gewonnen werden.

Biologische Auswertung:

Die aus den Ratten-Placenten gewonnene Trockensubstanz wurde im Tierversuch (Sayers-Test) auf ihre ACTH-Aktivität geprüft.

Von insgesamt 9 Versuchstieren wurden je drei Ratten 10.0 mg, 5.0 mg und 2.5 mg in 0.5 ml destilliertem Wasser gelöster Trockensubstanz im Rahmen des Sayers-Testes intravenös appliziert und der Ascorbinsäure-Abfall in den Nebennieren der hypophysektomierten Tiere nach der Methode von Roe und Kuether [9] bestimmt.

Ratten-Feten.

Wie die Ratten-Placenten so wurden auch die am 20. Tag der Gravidität entnommenen lebensfrischen Feten chemisch aufgearbeitet und auf ihre ACTH-Aktivität geprüft.

Aus 174 Feten (von 22 schwangeren Ratten) mit einem Gesamtgewicht von 460.03 g konnten nach Anwendung des oben beschriebenen Extraktionsverfahrens 3.94 g Trockensubstanz gewonnen werden.

Die Prüfung dieser Trockensubstanz auf ihre ACTH-Aktivität erfolgte wie bei den vorangehenden Untersuchungen über Ratten-Placenten mit Hilfe des Sayers-Testes.

Von insgesamt 9 Ratten injizierten wir je 3 Tieren 10.0 mg, 5.0 mg und 2.5 mg in 0.5 ml destilliertem Wasser gelöster Trockensubstanz intravenös und bestimmten den Ascorbinsäure-Abfall in den Nebennieren nach der Methode von Roe und Kuether [9].

Ergebnisse

In den am 20. Tag der Gravidität entnommenen Ratten-Placenten war unter den beschriebenen Versuchsbedingungen im Sayers-Test eine ACTH-Aktivität nachzuweisen.

Wie aus der Tab. 2 hervorgeht, beträgt der Ascorbinsäure-Abfall nach Verabreichung von Ratten-Placenta-Extrakt in einer Dosierung von 10,0 mg, 5,0 mg und 2,5 mg im Mittelwert 115, 69 und 10 pro 100 mg Nebennierengewebe. Auf die Eichkurve bezogen würden somit 10,0 mg Ratten-Placenta-Extrakt einer Aktivität von 3,0 I.E. ACTH entsprechen.

Auch die Gewebs-Extrakte der am 20. Tag der Gravidität entnommenen Ratten-Feten zeigten eine ACTH-Aktivität.

Im Vergleich zu den Placenta-Extrakten zeigten die Fetal-Extrakte der Ratte eine wesentlich geringere ACTH-Aktivität.

Der Ascorbinsäure-Abfall lag nach Verabreichung von Ratten-Fetal-Extrakt bei einer Dosierung von 10,0 mg, 5,0 mg und 2,5 mg im Mittelwert bei 80, 13 und 1 pro 100 mg Nebennierengewebe. D. h. nur bei einer Dosierung von 10,0 mg kommt es noch zu einem deutlichen Ascorbinsäure-Abfall, der nach der Eichkurve einer Aktivität von 2,3 I.E. ACTH entsprechen würde (s. Tab. 2).

Tabelle 2

Ascorbinsäure-Abfall nach Injektion von Placenta- und Fetal-Extrakten normaler Ratten (Sayers-Test)

	Placenta-Extrakte		Fetal-Extrakte	
	Ascorb.-Abfall	Mittelwert	Ascorb.-Abfall	Mittelwert
D ₃ (10,0 mg)	117	115	74	80
	105		76	
	103		90	
D ₂ (5,0 mg)	65	69	21	13
	83		2	
	58		14	
D ₁ (2,5 mg)	4	10	1	1
	12		0	
	15		2	

Zusammenfassung

Die eingangs gestellten Fragen glauben wir unter Hinweis auf die bekannten Mängel, die jeder biologischen Reaktion anhaften, auf Grund unserer Untersuchungen jedoch, wie folgt, beantworten zu können:

1. In der Placenta von Ratten ist unter den beschriebenen Versuchsbedingungen am Ende der Gravidität eine ACTH-Aktivität nachzuweisen.
2. Auch der Ratten-Fet zeigt am Ende der Schwangerschaft eine meßbare ACTH-Aktivität.
3. Im Vergleich zu den Placenta-Extrakten zeigen die Fetal-Extrakte der Ratte eine wesentlich geringere ACTH-Aktivität.

Zusammenstellung der bei den statistischen Berechnungen verwendeten Bezeichnungen

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate.

$S_{xx} = \sum (x - \bar{x})^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate x

$S_{yy} = \sum (y - \bar{y})^2$ = Summe der Abweichungsquadrate y

$S_{xy} = \sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ = Summe der Abweichungsquadrate des Produktes x y

f = Zahl der Freiheitsgrade.

MAQ = mittleres Abweichungsquadrat.

b = Steigung der Regressionsgeraden.

$n_1 b S_{xy}^{-1} = b S_{xy}$ = die SAQ der jeweiligen Regressionsgeraden.

L = Abweichungen von der Linearität der Regressionsgeraden.

$\sum d^2 = S_{yy} - b S_{xy}$ = „Reststreuung“.

s_y = die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} vom Mittelwert y

s_b = Streuung des Regressionskoeffizienten.

T = Prüfgröße (zur Sicherung des Regressionskoeffizienten).

- r_{xy} = Korrelationskoeffizient.
 s_y = die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} von der Regressionsgeraden.
 s_{yR} = die mittlere Abweichung des Mittelwertes vom Mittelwert der Regressionsgeraden.
 G_R = Gleichung der Regressionsgeraden.
 L = Abweichung von der Linearität der Regressionsgeraden.

Die statistischen Berechnungen wurden nach Koller, Mittenecker, Graf und Hennig durchgeführt.

Schrifttum

1. Gardner, W. U., und E. Allen: Anat. Rec., Philadelphia **83**, 75 (1942).
2. Graf, H., und H. J. Hennig: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953.
3. Greer, M. A.: Endocrinology **45**, 179 (1949).
4. Jöchle, W.: Endokrinologie, Leipzig **33**, 63 (1955).
5. Koller, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, in: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Bd. II, II. Teil. Berlin-Göttingen-Heidelberg. 1955.
6. Ders.: Statistische Auswertungsmethoden: in: H. M. Rauben, Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg. 1956.
7. Li, Ch. H., H. M. Evans und M. E. Simpson: J. Biol. Chem., Baltimore **149**, 413 (1943).
8. Mittenecker, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten. Wien. 1958.
9. Roe, J. H., und A. Kuether: J. Biol. Chem., Baltimore **147**, 399 (1943).
10. Sayers, G., und M. A. Sayers: Recent Progr. Hormone Res., N. Y. **2**, 81 (1948).
11. Strobel, E.: Arch. Gynäk. (im Druck).
12. Ders.: Arch. Gynäk. (im Druck).
13. Ders.: Z. Geburtsh., Stuttgart (im Druck).

(Eingang bei der Redaktion 30. 11. 1960)

ENDOKRINOLOGIE

Jährl. erscheinen 2 Bände mit je 6 Heften. Bezugspreis pro Band DM 36.— zuzügl. Portogebühren

Satz und Druck: Buchdruckerei Paul Dünnhaupt, Köthen

*Sonderabdruck aus **Endokrinologie***

Bd. 41 · Heft 1—2 · 1961

JOHANN AMBROSIUS BARTH | VERLAG | LEIPZIG

Printed in Germany

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen

(Direktor: Prof. Dr. R. D y r o f f)

Der Einfluß der Hypophysektomie auf die adrenocorticotrope Aktivität der Placenta und des Feten bei Ratten

Von E b e r h a r d S t r o b e l

In früheren Untersuchungen konnte in Placenten und Feten intakter Ratten am Ende der Gravidität eine adrenocorticotrope Aktivität nachgewiesen werden(37).

Auf Grund der Ergebnisse dieser und einer Reihe weiterer Untersuchungen (34, 35, 36) bleibt jedoch die Frage offen, inwieweit die Placenta von sich aus imstande ist, adrenocorticotrop wirksame Substanzen zu bilden, oder ob ihre Funktion nur darin besteht, das hypophysäre ACTH vorübergehend anzulagern, um es den jeweiligen gegebenen Erfordernissen entsprechend bereitstellen bzw. abgeben zu können.

Wir versuchten diese Frage durch operative Ausschaltung der Hypophyse im Tierexperiment weiter aufzuklären und dabei die folgenden Einzelfragen zu beantworten.

1. Kann in der Placenta hypophysektomierter Ratten eine ACTH-Aktivität nachgewiesen werden?
2. Besitzt der Fet hypophysektomierter Ratten eine adrenocorticotrope Aktivität?
3. Beeinflußt die Hypophysektomie die ACTH-Aktivität der Placenta und des Feten bei Ratten?
4. Findet in der Placenta, unabhängig von der Hypophyse, eine Produktion adrenocorticotrop-wirksamer Substanzen statt?

Aus operationstechnischen und wirtschaftlichen Gründen wurden die Untersuchungen an Ratten durchgeführt.

Im Hinblick auf die nachfolgenden Untersuchungen an hypophysektomierten Ratten sei auf die in zahlreichen Tierexperimenten gesammelten Erfahrungen mit den verschiedenen Methoden zur operativen Ausschaltung der Hypophyse hingewiesen (2, 3, 4, 7, 9, 10, 13, 15, 21, 25, 42 u. a.). Auf die einzelnen, für die Durchführung der Hypophysektomie bekannten Modifikationen (1, 8, 11, 18, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 32, 38, 39, 40, u. a.) soll hier nicht näher eingegangen werden.

Wir halten wie eine Vielzahl anderer Autoren (6, 41 u. a.) die von P. E. Smith angegebene, parapharyngeale Methode zur Hypophysektomie bei der Ratte für die zuverlässigste und zweckmäßigste Technik.

Die von D y r o f f angegebene nachfolgende Kaustikbehandlung, wobei nach Absaugen der Hypophyse der Bereich des Hypophysenstils vorsichtig elektrokoaguliert bzw. verschorft wird, verspricht entscheidende Sicherheit gegen eine evtl. unvollständige Entfernung der Hypophyse. Neben einer höheren Zuverlässigkeit in bezug auf exakte Entfernung besteht außerdem mehr Sicherheit gegen eine mögliche Nachblutung im Wundgebiet (D y r o f f), zu der es vor allem dann kommen kann, wenn die Trepanationsstelle zu weit rostral liegt (Weisschedel).

Versuchs anordnung

Entsprechend den Untersuchungen über die ACTH-Aktivität der Placenta intakter Ratten (37) prüften wir nun die ACTH-Aktivität von Ratten-Placenten nach Ausschaltung der Hypophyse.

Die 140 ± 20 g schweren Tiere eines Inzucht-Stammes wurden analog zu den Voruntersuchungen ausgewählt, im Östrus-Stadium für 24 Stunden zugelassen und der folgende Tag als erster Tag der Gravidität gerechnet.

Von insgesamt 30 schwangeren Ratten, die am 12. Tag der Gravidität hypophysektomiert wurden, kamen in den ersten drei Tagen post operationem 17 Tiere ad exitum. Bei den 13 überlebenden Ratten zeigte sich nach Tötung der Tiere mit Äther-Chloroform am 20. Tag der Schwangerschaft, daß bei zwei Ratten die Gravidität abgestorben und bei 4 Tieren die Hypophysektomie nicht vollständig durchgeführt worden war.

Die Vollständigkeit der Hypophysektomie wurde durch Gewichtskontrollen, fortschreitende Atrophie der Nebennierenrinde, makroskopische Kontrolle des Operationsgebietes und durch histologische Untersuchungen im Hypophysenbereich beurteilt.

So verbleiben für die weiteren Untersuchungen 7 hypophysektomierte, schwangere Ratten, bei denen am 20. Tag der Gravidität insgesamt 63 lebensfrische Placenten bzw. Feten (durchschnittliche Wurfzahl 9) entnommen werden konnten. Das Gesamtgewicht der Placenten betrug 24,56 g, das der Feten 137,71 g.

Bei der chemischen Aufarbeitung des Placenta- und Fetal-Gewebes der hypophysektomierten Ratten gingen wir nach der Methode, wie sie von Li, Evans und Simpson für die Isolierung von ACTH aus frischen Schweine-Hypophysen angaben, vor.

Mit diesem Extraktionsverfahren konnten aus 24,56 g Ratten-Placenten 0,107 g Trockensubstanz gewonnen werden. Die entsprechende Extraktion ergab aus 137,71 g Ratten-Feten 0,811 g Trockensubstanz.

Biologische Auswertung

Die aus den Placenten und Feten hypophysektomierter Ratten extrahierte Trockensubstanz wurde im Tierversuch (Sayers-Test) auf ihre ACTH-Aktivität untersucht.

Tabelle 1. Ascorbinsäure-Abfall nach Injektion von Placenta-Extrakten normaler und hypophysektomierter Ratten (Sayers-Test)

Dosis	normal		hypophysektomiert	
	Asc. Abfall	Mittelwert	Asc. Abfall	Mittelwert
D ₃ (10,0 mg)	117	115	106	106
	105		99	
	103		114	
D ₂ (5,0 mg)	65	69	41	46
	83		50	
	58		—	
D ₁ (2,5 mg)	4	10	9	6
	12		3	
	15		—	

Tabelle 2. Ascorbinsäure-Abfall nach Injektion von Fetal-Extrakt normaler und hypophysektomierter Ratten (Sayers-Test)

	normal		hypophysektomiert	
	Asc. Abfall	Mittelwert	Asc. Abfall	Mittelwert
D ₃ (10,0 mg)	74	80	49	47
	76		45	
	90			
D ₂ (5,0 mg)	21	13	0	
	3		0	
	14		0	
D ₁ (2,5 mg)	1	1	0	
	0		0	
	2			

Von insgesamt sieben Ratten wurden drei Tiere je 10,0 mg (D_3) und je zwei Tieren 5,0 mg (D_2) bzw. 2,5 mg (D_1) in 0,5 ml dest. Wasser gelöster Trockensubstanz (Placenta-Extrakt) intravenös verabreicht und der Ascorbinsäure-Abfall in den Nebennieren der hypophysektomierten Testtiere nach Roe und Kuether bestimmt (Tab. 1). Außerdem wurde in der gleichen Weise an weiteren sieben Ratten der Fetal-Extrakt auf seine ACTH-Aktivität getestet (Tab. 2).

Statistische Bearbeitung der Ergebnisse

Bei der folgenden statistischen Bearbeitung wurden die Ergebnisse der früheren Untersuchungen über die adrenocorticotrope Aktivität der Placenta und Feten intakter Ratten denen hypophysektomierter Ratten gegenübergestellt (Tab. 3).

Die Gegenüberstellung des durch Verabreichung von Placenta-Trockensubstanz hervorgerufenen Ascorbinsäure-Abfalls in den beiden Tiergruppen zeigt, daß bei allen drei Dosen die Mittelwerte des Abfalls bei den hypophysektomierten Tieren durchweg niedriger liegen als bei den normalen Tieren. Es erhebt sich nun die Frage, ob dieser Befund sich statistisch sichern läßt.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine Varianzanalyse (Mittenecker, Koller) durchgeführt. Es entsteht dabei eine Tabelle von 3mal 2 Gruppen, wovon sich je drei Gruppen auf die verabreichten Dosen, je zwei Gruppen auf die verschiedene Behandlungsart der Tiere beziehen (Tab. 3). Nach Errechnung der mittleren Quadrate unter Berücksichtigung der jeweiligen Freiheitsgrade¹⁾ kann dann mit Hilfe des F-Testes darüber ausgesagt werden, ob Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen nur durch die im Material vorhandene Zufallsstreuung bedingt sind, oder z. B. Einflüsse wirksam sind, die zu überzufälligen Unterschieden führen.

Das Ergebnis dieser Untersuchung, das in Tab. 3 in statistischen Größen zusammengefaßt ist, läßt sich folgendermaßen ausdrücken:

1. Der Anstieg des Ascorbinsäure-Abfalls mit zunehmender Dosis ist statistisch völlig gesichert (Wahrscheinlichkeit $\geq 99,9\%$), was sich auch, wie bereits früher beschrieben, in einer einwandfreien Eichkurve mit einem standardisierten ACTH-Präparat darstellen läßt (34).
2. Es ist „wahrscheinlich“ (Wahrscheinlichkeit zwischen 95% und 99%), aber noch nicht gesichert, daß bei den hypophysektomierten Tieren die ACTH-Aktivität der Placenten geringer ist als bei den normalen Tieren. Zu dieser Aussage ist eine Heranziehung des Zusammenwirkens der beiden Faktoren Dosis und Behandlung (der Wechselwirkung $D \times B$) erforderlich. Würde man nur auf die Behandlung allein ohne Berücksichtigung dieser Wechselwirkung Bezug nehmen, so wäre die Streuung in den

¹⁾ Mit der Anzahl der Freiheitsgrade wird die Anzahl der frei und unabhängig voneinander variablen Größen dieser Berechnung bezeichnet.

Tabelle 3. Ascorbinsäure-Abfall nach Injektion von Ratten-Placenta-Extrakt in Abhängigkeit von Dosis und Hypophysektomie

Behandlung		Dosis			Summe
		D ₁	D ₂	D ₃	
	B ₁ (normal)	1	65	117	
		12	83	105	
		15	58	123	
		$\sum x$ 31 $\sum x^2$ 385	206 14 478	345 39 843	
	B ₂ (hypophys- ektomiert)	9	41	106	
3		50	99		
			114		
$\sum x$ 12 $\sum x^2$ 90		91 4 181	319 34 033	422 38 250	
Gesamtsumme	$\sum x$ 43 $\sum x^2$ 475	297 18 659	664 73 876	1 004 93 010	

Quadratsummen: Total: $92\,656 - \frac{1004^2}{16} = 30\,009$

Zwischen den Gruppen: $\frac{31^2}{3} + \frac{206^2}{3} + \frac{345^2}{3} + \frac{12^2}{2} + \frac{91^2}{2} + \frac{319^2}{3} - \frac{1004^2}{16} = 29\,273$.

Hieraus ergibt sich durch Differenzbildung:

Quadratsumme zwischen allen Gruppen: 29 273

Quadratsumme innerhalb der Gruppen: 736

Total: 30 009

Weiter erhält man unter Aufgliederung der Quadratsumme zwischen allen Gruppen:

Quadratsumme zwischen D: $\frac{43^2}{5} + \frac{297^2}{5} + \frac{664^2}{6} - \frac{1004^2}{16} = 2849$

Quadratsumme zwischen B: $\frac{582^2}{9} + \frac{422^2}{7} - \frac{1004^2}{16} = 76$

Quadratsumme der Wechselwirkung D $\times$ B: $29\,273 - (28\,495 + 76) = 702$.

Quadratsummen		Anzahl der Freiheits- grade df	mittleres Quadrat	F	Wahrschein- lichkeit
a) Zwischen D:	28 495	2	14 248	194	$\geq 99,9\%$
b) Zwischen B:	76	1	76	1,03	$< 95\%$
c) Wechselwirkung D $\times$ B:	702	2	351	4,77	zwischen 95 und 99%
d) Innerhalb:	736	10	73,6		
Total:		30 009	15		

Tabelle 4. Ascorbinsäure-Abfall nach Injektion von Ratten-Fetal-Extrakt in Abhängigkeit von Dosis und Hypophysektomie

Behandlung		Dosis			Summe
		D ₁	D ₂	D ₃	
	B ₁ (normal)	2 1 3	22 4 15	75 77 91	
		$\sum x$ 6 $\sum x^2$ 14	41 725	243 19 835	
	B ₂ (hypophys- ektomiert)	1 1	1 1 1	50 46	
		$\sum x$ 2 $\sum x^2$ 2	3 3	96 4 616	
	Gesamtsumme	$\sum x$ 8 $\sum x^2$ 16	44 728	339 24 451	391 25 195

Quadratsumme:

$$\text{Total: } 25\,195 - \frac{391^2}{16} = 15\,639,94$$

$$\text{Zwischen den Gruppen: } \frac{6^2}{3} + \frac{41^2}{3} + \frac{243^2}{3} + \frac{2^2}{2} + \frac{3^2}{3} + \frac{96^2}{2} + \frac{391^2}{16} = 15\,321,07$$

$$\text{innerhalb der Gruppen: } 15\,639,94 - 15\,366,41 = 818,87$$

$$\text{Zwischen B}_1 \text{ und B}_2: \frac{290^2}{9} + \frac{101^2}{7} - \frac{391^2}{16} = 1\,246,67$$

$$\text{Zwischen D}_1, \text{ D}_2 \text{ und D}_3: \frac{8^2}{5} + \frac{44^2}{6} + \frac{339^2}{5} - \frac{391^2}{16} = 13\,759,57$$

$$\text{Wechselwirkung D} \times \text{B: } 15\,321,07 - (13\,759,57 + 1\,246,67) = 314,83.$$

Quadratsummen		Anzahl der Freiheits- grade df	mittleres Quadrat	F	Wahrschein- lichkeit
a) Zwischen D:	13 759,57	2	6 879,8	216	$\geq 99,9\%$
b) Zwischen B:	1 246,67	1	1 246,7	39,1	$< 99,9\%$
c) Wechselwirkung D $\times$ B:	314,83	1	157,4	4,93	zwischen 95 und 99%
d) Innerhalb:	318,87	10	31,9		
Total:	15 639,94	15			

beiden Gruppen B_1 und B_2 so groß, daß der Unterschied zwischen den hypophysektomierten und nicht operierten Tieren verdeckt bleiben würde.

In derselben Weise läßt sich auch die Frage behandeln, ob die Fetal-Extrakte der hypophysektomierten Ratten im Vergleich zu denen nicht operierter Tiere eine geringere ACTH-Aktivität haben (Tab. 4). In der ursprünglichen Wertetabelle (Tab. 2) des Ascorbinsäure-Abfalls treten jedoch „O-Werte“ auf. Deshalb wurde der in solchen Fällen übliche Kunstgriff angewandt, daß sämtliche Werte um 1 erhöht wurden, da sonst eine statistische Bearbeitung nicht möglich ist.

Die statistische Berechnung (Tab. 4) ergab folgendes:

1. Die Zunahme des Ascorbinsäure-Abfalls mit steigender Dosis ist einwandfrei gesichert (Wahrscheinlichkeit $\geq 99,9\%$).
2. Unter Berücksichtigung der Wechselwirkung $D \times B$ ist der Ascorbinsäure-Abfall bei den hypophysektomierten Tieren „wahrscheinlich“ (Wahrscheinlichkeit zwischen 95% und 99%) geringer als bei den normalen Tieren.
3. In diesem Fall ist jedoch schon statistisch völlig gesichert (Wahrscheinlichkeit $\geq 99,9\%$), daß die Hypophysektomie eine geringere ACTH-Aktivität zur Folge hat, ohne daß die Wechselwirkung zwischen Dosis und Behandlung zu dieser Beurteilung herangezogen zu werden braucht.

Das Ergebnis, daß die Hypophysektomie die ACTH-Aktivität der Placenten wie der Feten beeinflusst, erhält dadurch eine gewisse Stütze, daß in allen vier Versuchsreihen Kontrolltiere mitgeführt werden, bei denen der Ascorbinsäure-Abfall der verabreichten ACTH-Aktivität des Standard-Präparates entsprach.

E r g e b n i s s e

Bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse sind wir uns der mannigfaltigen Variabilität und der davon abhängigen möglichen Fehlerquellen, die einem Tierversuch anhaften können, bewußt. Nach den uns gegebenen Möglichkeiten versuchten wir, diese Mängel auf ein Minimum zu reduzieren. Jedoch ist bei der Deutung tierexperimenteller Untersuchungen zu berücksichtigen, daß es sich um die Bewertung biologischer Vorgänge handelt, die von einer Vielzahl unkontrollierbarer Faktoren beeinflusst werden. Trotz dieser Einschränkungen glauben wir, aus unseren Untersuchungen folgende Schlüsse ziehen zu können.

Sowohl im Placenta-Extrakt als auch im Fetal-Extrakt hypophysektomierter Ratten ist unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine ACTH-Aktivität nachweisbar. Dabei ließ sich der Anstieg des Ascorbinsäure-Abfalls mit zunehmender Dosis nach Verabreichung beider Extrakte statistisch sichern.

Nach der statistischen Berechnung ist es wahrscheinlich (Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99%), daß die Placenten der hypophysektomierten

Tiere eine geringere ACTH-Aktivität als die nicht operierter Ratten besitzen.

Die Fetal-Extrakte hypophysektomierter Ratten zeigten eine statistisch gesicherte, geringere ACTH-Aktivität im Vergleich zu den Fetal-Extrakten nicht hypophysektomierter Tiere.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, daß die am 12. Tag der Gravidität durchgeführte Hypophysektomie die adrenocorticotrope Aktivität der am 20. Tag der Schwangerschaft entnommenen Placenten und Feten im Sinne einer Aktivitätsminderung beeinflusst.

Hieraus läßt sich jedoch nicht ohne weiteres eine Abhängigkeit der ACTH-Produktion in der Rattenplacenta von der Hypophyse ableiten.

Schlüssig wäre die Beweisführung nur dann, wenn die ACTH-Produktion der Placenta bereits feststünde, was jedoch nicht geklärt ist, sondern wonach gefragt war.

Die verminderte adrenocorticotrope Aktivität könnte auch auf eine verminderte Stapelung nach operativer Ausschaltung der Hypophyse bezogen werden.

Auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse ist somit zunächst nur festzustellen, daß der Gehalt nicht die Produktion adrenocorticotrop wirksamer Substanzen der Rattenplacenta eine hypophysäre Abhängigkeit zeigt.

Wir sind jedoch der Anschauung, daß dieses Untersuchungsergebnis mit einer ausschließlichen Speicherfunktion der Placenta nicht ausreichend erklärt werden kann.

Da sich am Ende der Gravidität im Placenta-Gewebe von Ratten, die am 12. Tag der Schwangerschaft hypophysektomiert wurden, noch eine ACTH-Aktivität nachweisen läßt, kann angenommen werden, daß das Vorhandensein der Hypophyse nicht unbedingte Voraussetzung für einen positiven Nachweis einer ACTH-Aktivität in der Placenta ist. Dieser Überlegung folgend halten wir es durchaus für möglich, daß die Placenta zumindest nicht ausschließlich hypophysär gebildete, adrenocorticotrope Wirkstoffe aufnimmt, sondern vielmehr in einem bestimmten Ausmaß ACTH-aktive Substanzen zu bilden vermag. Inwieweit gegen Ende der Schwangerschaft bereits eine Kompensation durch die Frucht in Betracht kommt, ist noch ungeklärt.

Wir erachten diese Möglichkeit jedoch auf Grund unserer Untersuchungen über die ACTH-Aktivität von Fetal-Extrakt intakter und hypophysektomierter, schwangerer Ratten als unwahrscheinlich.

Z u s a m m e n f a s s u n g

In tierexperimentellen Untersuchungen wurde versucht, die Frage des Einflusses der Hypophysektomie auf die adrenocorticotrope Aktivität der Placenta und des Feten bei Ratten zu klären.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen war in den Extrakten aus Placenta- und Fetal-Gewebe der am 12. Tag der Gravidität hypophysektomierter Ratten am Ende der Gravidität eine adrenocorticotrope Aktivität nachweisbar.

Am Ende der Gravidität besitzen die Placenta- und Fetal-Extrakte hypophysektomierter Ratten eine geringere adrenocorticotrope Aktivität als die entsprechenden Extrakte nicht operierter Tiere.

Die am 12. Tag der Gravidität durchgeführte Hypophysektomie beeinflußt somit die adrenocorticotrope Aktivität der am 20. Tag der Schwangerschaft entnommenen Placenten und Feten im Sinne einer Aktivitätsminderung.

Die Frage einer placentaren Produktion bzw. Speicherung adrenocorticotrop wirksamer Substanzen wird diskutiert.

Zusammenstellung der bei den statistischen Berechnungen verwendeten Bezeichnungen

SAQ	= Summe der Abweichungsquadrate
S_{xx}	= $\sum (x - \bar{x})^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate x
S_{yy}	= $\sum (y - \bar{y})^2$ = Summe aller Abweichungsquadrate y
S_{xy}	= $\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ = Summe aller Abweichungsquadrate des Produktes $x \cdot y$
f	= Zahl der Freiheitsgrade
MAQ	= mittleres Abweichungsquadrat
b	= Steigung der Regressionsgeraden
$n_1 b S_{\bar{x}\bar{y}}$	= $b S_{xy}$ = die SAQ der jeweiligen Regressionsgeraden
L	= Abweichungen von der Linearität der Regressionsgeraden
$\sum d^2$	= $S_{yy} - b S_{xy}$ = „Reststreuung“
s_y^v	= die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} vom Mittelwert y
s_b	= Streuung des Regressionskoeffizienten
T	= Prüfgröße (zur Sicherung des Regressionskoeffizienten)
r_{xy}	= Korrelationskoeffizient
s_y	= die mittlere Abweichung der Einzelwerte y_{ij} von der Regressionsgeraden
s_{yR}	= die mittlere Abweichung des Mittelwertes vom Mittelwert der Regressionsgeraden
G_R	= Gleichung der Regressionsgeraden
L	= Abweichung von der Linearität der Regressionsgeraden

Die statistischen Berechnungen wurden nach Koller, Mittenecker, Graf und Henning durchgeführt.

S c h r i f t t u m

1. Anselmino, K. J., und R. I. Pencharz: Z. exper. Med. **93**, 660 (1935). — 2. Archangelskij, S.: Med.-biol. ž. **4**, 38, (1925). — 3. Aschner, B.: Pflügers Arch. Physiol. **146**, 1 (1912). — 4. Ascoli, G., und T. Legnani: Münch. med. Wschr. **59**, 518 (1912). — 5. Dies., zit. n. Ch. Bomskov: Methodik der Hormonforschung, Bd. II. Leipzig: 1939. — 6. Bomskov, Ch.: Methodik der Hormonforschung, Bd. II. Leipzig: 1939. — 7. Camus, J., und Housay: J. physiol. e. path. gén., Paris **20**, 509 (1922). — 8. Collip, J. B.: J. Mount Sinai Hosp., N. Y. **1**, 28 (1934). — 9. Cushing, H.: Bull. Johns Hopkins Hosp. **50**, 137 (1932). — 10. Dandy, W. E., und F. L. Reichert: Bull. Johns Hopkins Hosp., **37**, 1 (1925). — 11. Dyke, van, H. B., und Z. Wallen-

- Lawrence: J. Pharmacol. Exper. **40**, 413 (1930). — 12. Dyroff, R.: Persönliche Mitteilung. — 13. Felding, S.: Nord. med. tskr. **I**, 396 (1931). — 14. Graf, H., und H. J. Henning: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: 1953. — 15. Houssay, B. A., und Hug: Compt. rend. Soc. Biol. **83**, 1215 (1921). — 16. Koller, S.: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, in: Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. II, II. Teil. Berlin-Göttingen-Heidelberg: 1955. — 17. Ders.: Statistische Auswertungsmethoden: in: H. M. Rauben, Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: 1956. — 18. Koyama, R.: Jap. J. med. Sc. **5**, 41 (1931). — 19. Lamonaço, van Rijnberk und Gaglio: zit. n. Ch. Bomskov, Methodik der Hormonforschung, Bd. II, S. 554. Leipzig: 1939. — 20. Li, C. H. H., H. M. Evans und M. E. Simpson: J. Biol. Chem., Baltimore **149**, 413 (1943). — 21. Lubberhuizen, H. W.: De ontwikkeling van de hypophysis cerebri bij het schaap. Inaug.-Diss. Leiden 1927. — 22. Marinesco und Fichera: zit. n. Ch. Bomskov, Methodik der Hormonforschung, Bd. II, S. 554. Leipzig: 1939. — 23. Mittelnecker, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten. Wien: 1958. — 24. Möller und E. Christensen: Acta path. microbiol. Scand. **10**, 296 (1933). — 25. Paulesco, N.-C.: L'hypophyse du cerveau, Paris 1907. — 26. Pencharz, R. L., und J. A. Long: Amer. J. Anat. **53**, 117 (1933). — 27. Reiss, M., H. Druckrey und A. Hochwald: Endocrinology **12**, 243 (1933). — 28. Richter, F. F., und G. B. Wislocki: Amer. J. Physiol. **95**, 481 (1931). — 29. Roe, J. H., und A. Kuether: J. Biol. Chem., Baltimore **147**, 399 (1943). — 30. Sayers, G., und M. A. Sayers: Recent Progr. Hormone Res., N. Y. **2**, 81 (1948). — 31. Smith, P. E.: J. Amer. Med. Ass. **88**, 158 (1927). — 32. Smith, P. E., und I. B. Smith: Endocrinology **7**, 579 (1923). — 33. Smith, Walker und Graeser: zit. n. Ch. Bomskov, Methodik der Hormonforschung, Bd. II, S. 572. Leipzig: 1939. — 34. Strobels, E.: Arch. Gynäk. **194**, 433 (1961). — 35. Ders.: Arch. Gynäk. **194**, 452 (1961). — 36. Ders.: Z. Geburtsh. Stuttgart, im Druck. — 37. Ders.: Endokrinologie. Leipzig, im Druck. — 38. Thompson, D. W.: Endocrinology **16**, 257 (1932). — 39. Wehefritz, E.: Zbl. Gynäk. **56**, 2911 (1932). — 40. Wehefritz, E., und E. Gierhake: Endokrinologie, Leipzig **11**, 241 (1932). — 41. Weisschedel, E.: Dt. Z. Chir. **259**, 223 (1943). — 42. Woerdemann: Arch. mikrosk. Anat. **86**, 198 (1914).

Anschr. d. Verf.:

Priv.-Doz. Dr. E. Strobels

Univ.-Frauenklinik, Erlangen

(Eingang bei der Redaktion: 29. 12. 1960)

ENDOKRINOLOGIE

Jährl. erscheinen 2 Bände mit je 6 Heften. Bezugspreis pro Band DM 36.— zuzügl. Portogebühren

Satz und Druck: Buchdruckerei Paul Dünnhaupt, Köthen.

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. R. DYBOFF)

**Der Einfluß der Hypophysektomie
auf das Placenta- und Fetalgewicht der Ratte**

Von

EBERHARD STROBEL

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Dezember 1960)

Bei früheren Untersuchungen über die adrenocorticotrope Aktivität der Placenta und des Feten bei Ratten^{25, 26} fiel uns eine Größendifferenz der am Ende der Gravidität entnommenen Placenten und Feten zwischen intakten und hypophysektomierten Ratten auf. Wir hatten zunächst den Eindruck gewonnen, daß die Placenten und Feten hypophysektomierter Ratten am Ende der Schwangerschaft ein geringeres Gewicht zeigen, als die Placenten und Feten intakter Tiere.

Auf Grund dieser Beobachtung und der diesbezüglichen in der Literatur vorliegenden uneinheitlichen Untersuchungsergebnisse führten wir insgesamt 754 Gewichtsbestimmungen von Placenten und Feten intakter, scheinhypophysektomierter und hypophysektomierter Ratten am Ende der Gravidität durch und versuchten, damit folgende Fragen zu klären: *Beeinflußt die Hypophysektomie bzw. die Scheinhypophysektomie das Placenta- und Fetalgewicht der Ratte?*

Bevor wir zu dieser Frage Stellung nehmen, erscheinen uns einige kurze Ausführungen über den *Einfluß der Hypophysektomie auf den Schwangerschaftsverlauf bei Tieren* unumgänglich.

Die in der Literatur vorliegenden Untersuchungen über den Einfluß der Hypophysektomie auf den Schwangerschaftsverlauf bei Tieren zeigen zum Teil verschiedene Ergebnisse und sind in erster Linie von der Species der Versuchstiere abhängig. Außerdem sind hierbei der Zeitpunkt der Hypophysektomie, die Placentation und evtl. die muskuläre Massierung des Uterus bei den verschiedenen Tierarten zu berücksichtigen. Aber auch Untersuchungen bei der gleichen Tierart zeigen nicht immer einheitliche Resultate.

Der Einfluß der Hypophysektomie auf die Schwangerschaft wurde am häufigsten bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten verfolgt. Die Ergebnisse waren in Abhängigkeit von der Tierart und der Art und Ausdehnung der Operation sehr verschieden (BÜTTNER³). Nur diejenigen Tiere antworteten auf die Entfernung der Hypophyse mit Unterbrechung

der Trächtigkeit, bei denen die Hypophyse die Funktion der Gelbkörper kontrolliert (ROBSON¹⁹). So führt die Hypophysektomie beim Kaninchen zum Aufhören der Funktion des Gelbkörpers und damit zum Abort (FIROR¹⁰, ROBSON¹⁹, WHITE u. LEONHARD²⁸). Ebenso verhält es sich bei der Hündin (ASCHNER, HOUSSAY¹⁴).

Daneben gibt es eine weitere Gruppe von Tieren, zu der das Meerschweinchen gehört, bei denen die Hypophysektomie nicht regelmäßig einen Abort herbeiführt, obgleich die Gelbkörper atrophieren (PENCHARZ u. LYONS¹⁷). Bei diesen Tieren führt auch die Entfernung der Ovarien in den letzten Stadien der Schwangerschaft nicht immer zum Abort.

Zu einer dritten Gruppe gehören schließlich Ratte und Maus (SELYE, COLLIP u. THOMSON²²). Es handelt sich um solche Tiere, bei denen die Hypophysektomie in bestimmten Stadien der Schwangerschaft weder zum Abort führt, noch eine Degeneration der Gelbkörper verursacht.

Die Hypophysektomie während der ersten Schwangerschaftshälfte führt bei der Ratte stets zum Abort oder zur Resorption der Fruchtlanlage (BOMSKOV²). HATERIUS¹³ hat nachgewiesen, daß die Ratte ihre Gelbkörper zur Erhaltung der Gravidität mindestens während des letzten Drittels nicht unbedingt braucht. PENCHARZ u. LONG¹⁶ beobachteten bei Ratten nach Hypophysektomie bis zum 12. Tag der Schwangerschaft Resorption der Früchte, bei einem späteren Zeitpunkt der Hypophysektomie jedoch Verlängerung der Tragzeit mit Geburt toter Feten. SELYE, COLLIP und THOMSON²² fanden nach Hypophysektomie zwischen dem 11. und 14. Tag bei einer gewissen Anzahl von Ratten Resorption der Feten oder Abort. Wenn jedoch die Schwangerschaft intakt blieb, war der Geburtsmechanismus nicht gestört.

BERGMANN berichtet über 33 Ratten, von denen nach Hypophysektomie zwischen dem 10. und 14. Schwangerschaftstag 22 an den Operationsfolgen starben. Die überlebenden Ratten warfen nur selten zum richtigen Zeitpunkt. Nach der Meinung der Mehrzahl der Autoren (CUTULY⁸; BERGMANN; COLLIP, SELYE u. THOMSON⁵; SELYE, COLLIP u. THOMSON⁵, PENCHARZ u. LONG¹⁶; GREER¹²; KNOBIL u. CATON¹⁵ u. a.) wird die Gravidität bei der am 12. Schwangerschaftstag oder später durchgeführten Hypophysektomie bei Ratten nicht unterbrochen. Im Gegensatz hierzu berichten WILLING u. SCHRIMPF²⁹ über 26 schwangere Ratten, von denen alle Tiere, die im 1., 2. oder 3. Drittel der Schwangerschaft hypophysektomiert wurden, 48 Std post operationem zugrunde gingen.

Wir nehmen an, daß diese teilweise widersprechenden Ergebnisse u. a. im wesentlichen auf die bei der Hypophysektomie angewandte operative Technik zurückzuführen sind. Wir wir bei über 500 Hypophysektomien wiederholt feststellen konnten, sind für eine Erhöhung der Mortalität häufig schon geringe Abweichungen von der Operationsmethode mit

nachfolgenden cerebralen Schädigungen verantwortlich zu machen. Schwangere Ratten sind u. E. derartigen Schädigungen gegenüber empfindlicher. So konnten wir unter analogen Versuchsbedingungen bei gleicher operativer Technik bei nicht schwangeren Ratten eine Gesamtmortalität von 10—15%, bei schwangeren Tieren jedoch eine Gesamtmortalität von 30—55% innerhalb der ersten 8 Tage post operationem beobachten.

Zu der von uns untersuchten Frage über den *Einfluß der Hypophysektomie auf das Placenta- und Fetalgewicht bei Ratten* liegt eine Arbeit von KNOBIL u. CATON¹⁵ aus dem Jahre 1953 vor. Diese Autoren arbeiteten mit insgesamt 22 schwangeren Ratten, wovon 14 am 12. Schwangerschaftstag hypophysektomiert wurden und 8 schwangere Tiere als Kontrolle dienten. Am 21. Schwangerschaftstag fanden KNOBIL u. CATON¹⁵ einen signifikanten Abfall der Fetalgewichte und einen geringen Abfall der Placentagewichte bei den hypophysektomierten im Vergleich zu den 8 scheinhypophysektomierten Tieren, deren Allgemeinbefinden in keiner Weise gestört war, in ihrem Verhalten nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden waren.

Dagegen berichten CAMPELL, INNES u. KOSTERLITZ⁴, daß die am 13. oder 15. Tag der Gravidität bei Ratten durchgeführte Hypophysektomie eine Abnahme des Fetalgewichtes am 21. Tag der Schwangerschaft bewirkte, die jedoch keine statistische Signifikanz zeigte. Wie aus diesen Arbeiten hervorgeht, wird die Frage des Einflusses der Hypophysektomie auf das Placenta- und Fetalgewicht bei der Ratte uneinheitlich beantwortet.

Versuchsanordnung

Bei den eigenen Untersuchungen gingen wir wie folgt vor:

Auswahl der Tiere

Wir verwendeten reingezüchtete Ratten eines Wistar-Stammes, um den Forderungen einer weitgehenden Homogenität des Tiermaterials zu entsprechen. Die Versuchstiere waren gleich alt und zeigten ein Gewicht von 160 ± 20 g. Unterbringung, Pflege und Fütterung waren für alle Tiere vollkommen gleichartig. Vor allem wurde darauf geachtet, daß sämtliche Tiere die gleiche begrenzte Futtermenge erhielten.

Cyclusbestimmung

Bei den einzelnen Tieren führten wir zur Klärung des vorliegenden Cyclusstadiums täglich durch Einführen einer Platinöse in die Vagina des Tieres Abstriche durch. Das der Platinöse anhaftende Zellmaterial wurde auf einem Objektträger ausgetrischen, getrocknet, mit Methylenblau gefärbt und anschließend das Zellbild ausgewertet. Wir konnten somit Ratten, die sich nach der Abstrichkontrolle im Oestrus befanden,

auswählen. Diese Tiere wurden während 24 Std gepaart und der folgende Tag als erster Tag der Gravidität gewertet.

Gruppeneinteilung der Tiere

Am 12. Tag nach der Paarung überzeugten wir uns durch eine Laparotomie von dem Vorliegen einer Schwangerschaft und teilten die schwangeren Tiere in 3 Gruppen auf. Dabei wurde im Anschluß an die Laparotomie die 1. Tiergruppe hypophysektomiert (Tabelle 3), die 2. Gruppe scheinhypophysektomiert (Tabelle 2) und bei der 3. Gruppe (Tabelle 1), die als Kontrollgruppe diente, erfolgte kein weiterer operativer Eingriff. Bei der 2. Tiergruppe führten wir eine sog. Scheinhypophysektomie durch, um den Einfluß des operativen Traumas unabhängig von der Hypophysektomie auf das Placenta- und Fetalgewicht beurteilen zu können. Von insgesamt 209 gepaarten Ratten konnte nach 12 Tagen durch Laparotomie bei 76 Ratten eine Gravidität festgestellt werden. Davon wurden 31 Ratten hypophysektomiert, 23 Tiere scheinhypophysektomiert und 22 schwangere Versuchstiere dienten als Kontrolle.

Operative Technik

Wir verwendeten bei der Hypophysektomie folgende Technik: Die Ratte wird vor der Operation in einem Glasgefäß mit Äther narkotisiert und dann mit dem Rücken nach unten und Kopf dem Operateur zugekehrt in Längsrichtung auf dem Operationstisch gut ausgespannt und fixiert. Die Atmung muß völlig ungehindert sein. Nach äußerer Desinfektion mit Alkohol wird die Haut durch einen medianen Längsschnitt vom Jugulum bis nahe an das Kinn gespalten und die stark entwickelten, subcutan gelegenen Speicheldrüsen rechts und links zur Seite gedrängt. In dem Winkel zwischen Trachea und dem rechten Zungenbeinast wird die oberflächliche Halsmuskulatur in Faserrichtung stumpf gespalten und mit 2 Pinzetten gespreizt. Auf dem Grund der so entstandenen Lücke sieht man die tiefen Halsmuskeln, die in der Medianlinie eine deutliche Raphe besitzen. Oralwärts wird die hintere Rachenwand wie ein in querer Richtung ausgespannter Vorhang sichtbar. Nach vorsichtiger Abdrängung der hinteren Rachenwand oralwärts und Abschabung der tiefen Halsmuskulatur von der Schädelbasis caudalwärts kommt die Synchrondosis sphenoccipitalis, die als bläuliche, etwas erhabene Linie in querer Richtung über die Schädelbasis verläuft, zur Darstellung. Ist die Kreuzungsstelle zwischen dieser Knorpelfuge und der Raphe in genügendem Umfang freigelegt, so wird nach einer Tracheotomie die Trachea und die hintere Rachenwand schräg nach der linken Seite des Tieres und oralwärts beiseite gehalten, und ein Loch in die Schädelbasis in der Weise gebohrt, daß die Knorpelfuge durch dessen caudales Drittel verläuft. Über der Hypophyse, die sich als rötlich-weiße Kugel in das

Loch vorwölbt, wird die Durakapsel mit einer scharfen Nadel entlang dem Rand des Loches eingerissen und die Hypophyse mit einer Glaspipette abgesaugt. Nach vollständiger Entfernung der Hypophyse erfolgt der Verschuß der Wunde durch eine Hautnaht.

Die von DYROFF angegebene nachfolgende Kaustikbehandlung, wobei nach Absaugen der Hypophyse der Bereich des Hypophysenstiels vorsichtig elektrocoaguliert bzw. verschorft wird, verspricht entscheidende Sicherheit gegen eine evtl. unvollständige Entfernung der Hypophyse. Neben einer höheren Zuverlässigkeit in bezug auf exakte Entfernung besteht außerdem mehr Sicherheit gegen eine mögliche Nachblutung im Wundgebiet (DYROFF), zu der es vor allem dann kommen kann, wenn die Trepanationsstelle zu weit rostral liegt (WEISSCHEDEL²⁷).

1. Gruppe (hypophysektomierte Ratten)

Von den 31 im Anschluß an die Laparotomie (am 12. Schwangerschaftstag) hypophysektomierten, schwangeren Ratten kamen (nach 24 Std 4, nach 48 Std 6 und nach 72 Std 7) innerhalb der ersten 3 Tage post operationem insgesamt 17 Tiere an den Operationsfolgen ad exitum. Am 20. Tag der Gravidität wurden die 14 überlebenden hypophysektomierten, schwangeren Ratten mit Äther-Chloroform getötet und die Placenten und Feten entnommen, von Blut und Fruchtwasser gereinigt und einzeln in einem geschlossenen Wägegläschen gewogen (s. Tabelle 3).

Die *Vollständigkeit der Hypophysektomie* wurde beurteilt durch:

1. Kontrolle des Gewichtes (unmittelbar vor der Paarung, am 12. und am 20. Tag der Gravidität).
2. Fortschreitende Atrophie der Nebennierenrinde.
3. Inspektion des Operationsgebietes.
4. Histologische Untersuchungen im Hypophysenbereich.

An Hand histologischer Untersuchungen zeigte sich, daß bei 5 Tieren kleine Hypophysenreste, deren Funktionstüchtigkeit nicht sicher beurteilt werden konnte, nach der Operation zurückgeblieben waren und damit die Hypophysektomie nicht vollständig durchgeführt war. Diese Tiere wurden für die nachfolgenden Untersuchungen nicht verwertet.

2. Gruppe (scheinhypophysektomierte Ratten)

Bei der 2. Tiergruppe wurde am 12. Tag der Gravidität im Anschluß an die Laparotomie eine sog. Scheinhypophysektomie durchgeführt. Dabei erfolgte wie bei der Hypophysektomie die Trepanation der Schädelbasis. Die freigelegte Hypophyse wurde jedoch nicht entfernt. Von den 23 derart operierten Tieren kamen 3 1—2 Tage post operationem ad exitum. Am 20. Tag der Schwangerschaft wurden die 20 überlebenden Tiere ebenfalls mit Äther-Chloroform getötet und die lebensfrischen

Feten und Placenten entnommen, von Blut und Fruchtwasser gereinigt und einzeln in einem geschlossenen Wägegläschen gewogen (s. Tabelle 2).

3. Gruppe (intakte Ratten)

Bei der Kontrollgruppe (22 Tiere) erfolgte lediglich am 12. Tag nach der Paarung durch Laparotomie die Feststellung der Schwangerschaft. Auch diese Gruppe wurde am 20. Tag der Gravidität mit Äther-Chloroform getötet und die lebensfrischen Feten und Placenten entnommen, von Blut und Fruchtwasser gereinigt und einzeln in einem geschlossenen Wägegläschen gewogen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Placenta- und Fetalgewichte bei Ratten*

Gruppe	Anzahl	Schwanger	Wurf- zahl	Placenta		Fet	
				Gesamt- gewicht in g	Durch- schnitts- gewicht in g	Gesamt- gewicht in g	Durch- schnitts- gewicht in g
V	6	2	11	4,4617	0,4056	23,6108	2,1464
			1	1,0658	1,0658	3,0945	3,0945
A ₂	1	1	3	1,4427	0,4809	7,0161	2,3387
C ₂	5	2	7	4,1427	0,5918	21,6139	3,0877
			1	0,8057	0,8057	2,5195	2,5195
E ₂	3	1	10	4,4929	0,4493	27,7597	2,7760
I ₂	6	2	9	3,9059	0,4340	14,4329	1,6037
			7	4,1100	0,5871	12,5176	1,7882
K ₂	15	2	11	4,8438	0,4403	25,7042	2,3367
			16	6,0899	0,3806	35,5557	2,2222
L ₂	15	3	9	3,8478	0,4275	21,4001	2,3778
			12	4,9102	0,4092	30,0780	2,5065
			11	4,4066	0,4006	27,6801	2,5164
M ₂	15	4	8	4,1015	0,5127	25,3005	3,1626
			6	2,8715	0,4786	20,6014	3,4337
			4	2,1668	0,5417	14,5423	3,6356
			13	5,0977	0,3921	44,5760	3,4289
N ₂	13	4	9	4,5430	0,5048	28,1132	3,1237
			5	2,5322	0,5064	16,1873	3,2375
			8	3,5900	0,4487	26,1053	3,2632
			10	4,3539	0,4354	23,5782	2,3578
O ₂	11	1	3	1,5455	0,5152	8,0387	2,6796
Summe	95	22	174	79,3278	11,2140	460,0260	59,6369
Mittelwert			7,9	0,4559	0,5097	2,6438	2,7107

Die aus der oben angegebenen Versuchsanordnung gewonnenen Ergebnisse (Tabelle 1, 2 u. 3) wurden nun statistisch bearbeitet. Wie aus der nachfolgenden statistischen Berechnung hervorgeht, wird das Ergebnis durch die Unterschiede der Gruppengrößen (9:20:22 Tiere) nicht beeinflußt.

Tabelle 2. *Placenta- und Fetalgewicht bei scheinhypophysektomierten Ratten*

Gruppe	Anzahl	Schwanger/ Schein- hypophys. (12. Tag)	Am 20. Tag gelebt	Wurf- zahl	Placenta		Fet	
					Gesamt- gewicht in g	Durch- schnitts- gewicht in g	Gesamt- gewicht in g	Durch- schnitts- gewicht in g
A ₁	8	3	3	8	4,2015	0,5252	25,0100	3,1263
				6	2,7710	0,4618	20,5021	3,4170
				15	5,6212	0,3747	31,2315	2,0821
B ₁	10	5	4	5	2,4210	0,4842	15,8927	3,1785
				7	4,6255	0,6608	22,3120	3,1874
				2	1,0341	0,5171	5,2013	2,6007
				6	2,8617	0,4770	20,5317	3,4220
C ₁	6	3	3	10	4,4213	0,4421	22,4311	2,2431
				4	2,0217	0,5054	15,0077	3,7519
				16	6,1283	0,3830	34,0281	2,1268
D ₁	9	5	4	4	2,1671	0,5418	14,1792	3,5448
				5	2,3876	0,4775	15,2037	3,0407
				8	3,9879	0,4985	24,1932	3,0242
				4	2,0754	0,5189	14,7831	3,6958
F ₁	6	4	4	2	0,8735	0,4368	5,9832	2,9916
				10	4,4873	0,4487	25,9910	2,5991
				7	3,2968	0,4710	19,6934	2,8133
				5	1,5420	0,3084	13,2010	2,6402
G ₁	6	3	2	7	4,0019	0,5717	14,2780	2,0397
				9	3,4592	0,3844	15,7140	1,7460
Summe	45	23	20	140	64,3860	9,4890	375,3680	57,2512
Mittelwert				7,0	0,4599		2,6812	

Tabelle 3. *Placenta- und Fetalgewichte bei hypophysektomierten Ratten*

Gruppe	Anzahl	Schwanger/ hypophys. (12. Tag)	Exitus post op.			Am 20. Tag gelebt	Wurfzahl	Placenta		Fet	
			21	48	72			Gesamt- gewicht in g	Durch- schnitts- gewicht in g	Gesamt- gewicht in g	Durch- schnitts- gewicht in g
A	5	3	1	1	1	1		(Gravid. am 12. Tag abgestorben)			
C	5	2			1	1	11	3,8950	0,3541	21,1787	1,9254
D	3	1	1								
E	3	1				1	15	5,3457	0,3564	31,4801	2,0987
F	5	1		1							
G	2	1		1							
H	3	3	2			1	12	4,8249	0,4021	27,5966	2,2997
Q	9	3				2	11	4,2110	0,3828	23,6523	2,1502
							8	3,2838	0,4105	17,2354	2,1544
								(Gravid. am 12. Tag abgestorben)			
S	6	2			1	1	4	2,0574	0,5143	10,0780	2,5195
T	4	1		1							
U	3	1			1						
W	4	1				1	2	0,9422	0,4711	6,4923	3,2461
X	7	3		1	2						
Z	5	3		2	1						
Summe	64	26	4	6	7	9	63	24,5600	2,8913	137,7134	16,3940
			17								
Mittelwert						9,0		0,3898	0,4130	2,1859	2,3420

Statistische Berechnung

Placentagewichte

Die Gesamtgewichte der Placenten, die in Abb. 1 in Abhängigkeit von der Wurfgroße aufgetragen sind, steigen nicht linear mit der Wurfgroße an. Sie folgen vielmehr einer Kurve der allgemeinen Form $G = c^3/z^2$, wobei G das Gesamtgewicht der Placenten, z die Wurfgroße und c einen Proportionalitätsfaktor bedeuten, der nahe bei 1 liegt. Diese Formel läßt sich so deuten, daß jedem Fet ein Teil der Gesamtplacenta zugeordnet

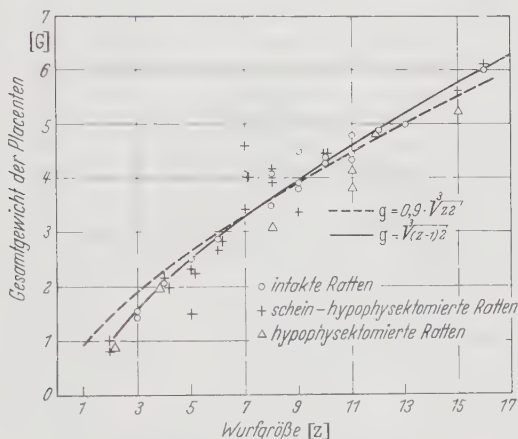


Abb. 1. Gesamtgewicht der Placenten in Abhängigkeit von der Wurfgroße

ist, das Gesamtgewicht der Placenten aber nicht mit der dritten Wurzel aus der Anzahl sondern aus den Flächen der Teilbereiche ansteigt.

Abgesehen von den Gewichten bei der Wurfgroße 1 weichen jedoch die Gewichte zwischen $z = 2$ bis etwa $z = 6-7$ systematisch von dieser Kurve, die in Abb. 1 gestrichelt eingetragen ist, ab. Aus diesem Grunde wurden zur weiteren Berechnung die beiden Werte für $z = 1$ bei den nicht hypophysectomierten Tieren weggelassen und die experimentellen Gewichte so behandelt, wie wenn sie einer Regressionslinie mit der Gleichung $G = \sqrt[3]{(z-1)^2}$ folgen würden (vgl. ausgezogene Kurve in Abb. 1).

Die statistische Bearbeitung geschieht nun derart, daß zuerst die experimentell ermittelten Gewichte G durch die für die zugehörige Wurfgroße z berechnete Wurzel dividiert (Tabelle 4) und dadurch „normalisiert“ werden. Diese Größen g liegen ohne eine von der Wurfgroße abhängige, wesentliche systematische Abweichung nahe bei 1, wie aus der Spalte 3 der Tabelle 4 zu ersehen ist. Wird für diese „normalisierten“ Gewichte g die übliche Mittelwerts- und Streuungsberechnung angeschlossen, so erhält man folgende Mittelwerte und Streubereiche (Tabelle 4, 5 u. 6):

1. bei normalen Tieren $M_1 = 1,025 \quad s_1 = \pm 0,093,$
2. bei scheinhypophysektomierten Tieren $M_2 = 1,006 \quad s_2 = \pm 0,151,$
3. bei hypophysektomierten Tieren $M_3 = 0,925 \quad s_3 = \pm 0,050.$

Tabelle 4

Normale Tiere: Gesamtgewichte der Placenten in Abhängigkeit von der Wurfgröße

z	G	$\frac{G}{\sqrt{(z-1)^2}}$	$M_1 - g$	$(M_1 - g)^2$
16	6,090	1,000	-25	625
13	5,098	0,973	-52	2704
12	4,910	0,991	-34	1156
11	4,462	0,961	-64	4096
	4,844	1,042	+17	289
	4,407	0,950	-75	5625
10	4,493	1,038	+13	169
	4,354	1,007	-18	324
9	3,906	0,977	-48	2304
	3,848	0,962	-63	3969
	4,543	1,135	+110	12100
8	4,102	1,120	+95	9025
	3,590	0,980	-45	2025
7	4,143	1,252	+227	51529
	4,110	1,245	+220	48400
6	2,872	0,980	-45	2025
5	2,532	1,005	-20	400
4	2,167	0,995	-30	900
3	1,443	0,910	-115	13225
	1,546	0,978	-47	2209
Summe		20,501	+0,001	163099

$$s_1^2 = \frac{163099 - 20,1^2}{19} = 8583$$

$$s_1 = \pm 93$$

$$\text{Mittelwert: } M_1 = 1,025 \pm 0,093$$

In der 2. Gruppe von Tieren ist zwar die Streuung größer als in der 1. Gruppe, jedoch ist die Differenz dieser beiden Mittelwerte so gering, daß eine Zusammenfassung dieser beiden Gruppen (intakte und scheinhypophysektomierte, schwangere Tiere) berechtigt ist. Der gemeinsame Mittelwert beider Gruppen beträgt: $M = 1,015 \pm 0,124$. Unter Rückverwandlung in wahre Gewichte G besagt dieses Ergebnis, daß im Mittel das Placentagewicht bei den normalen bzw. den scheinhypophysektomierten Tieren z. B. bei $z = 4$ $G = 2,11 \pm 0,26$ g und bei $z = 12$ $G = 5,02 \pm 0,62$ g beträgt. Beim Vergleich der mittleren Gewichte aus den zusammengefaßten ersten beiden Gruppen mit denjenigen der hypo-

Tabelle 5. *Scheinhypophysektomierte Tiere: Gesamtgewichte der Placenten in Abhängigkeit von der Wurfgröße*

z	G	$\frac{G}{\sqrt[3]{(z-1)^2}}$	$M_2 - g$	$(M_2 - g)^2$
16	6,128	1,009	+ 3	9
15	5,621	0,966	— 40	1600
10	4,421	1,021	— 15	225
	4,487	1,038	— 32	1024
9	3,459	0,865	— 141	881
8	4,202	1,148	+ 142	20164
	3,988	1,090	+ 84	7065
7	4,626	1,400	+ 394	155236
	3,297	1,000	— 6	36
	4,002	1,212	+ 206	42436
6	2,771	0,946	— 60	3600
	2,862	0,978	— 28	784
5	2,421	0,960	— 46	2116
	2,388	0,946	— 60	3600
	1,542	0,612	— 394	155236
4	2,022	0,971	— 35	1225
	2,176	1,043	— 37	1369
	2,075	1,000	— 6	36
2	1,034	1,034	+ 28	784
	0,874	0,874	— 132	17424
Summe		20,113	— 0,007	433841

$$s_2^2 = \frac{1}{19} (433841 - 20,7^2) = 432861$$

$$S_2 = \pm 0,151$$

$$\text{Mittelwert: } M_2 = 1,006 \pm 0,151$$

Tabelle 6. *Hypophysektomierte Tiere: Gesamtgewicht der Placenten in Abhängigkeit von der Wurfgröße*

z	G	$\frac{G}{\sqrt[3]{(z-1)^2}}$	$M_3 - g$	$(M_3 - g)^2$
15	5,346	0,920	— 5	25
12	4,825	0,975	— 50	2500
11	3,895	0,842	— 83	6889
11	4,211	0,910	— 15	225
8	3,284	0,895	— 30	900
4	2,057	0,990	+ 65	4225
2	0,942	0,942	+ 17	289
Summe		6,484	— 0,001	15053

$$s_3^2 = \frac{1}{6} (15053 - 7) = 2509$$

$$s_3 = \pm 50$$

$$\text{Mittelwert: } M_3 = 0,925 \pm 0,050$$

physektomierten Tiere erhält man nach GEBELEIN u. HEITE eine Prüfgröße $Q = 1,8$; d. h. da Q kleiner als 2 ist, besteht *kein Unterschied zwischen den Placentagewichten der hypophysektomierten und nicht hypophysektomierten Tiere*. Die Hypophysektomie hat somit keinen Einfluß auf das Placentagewicht bei der Ratte.

Gewichte der Feten

Werden die durchschnittlichen Gewichte der Feten in Abhängigkeit von der Wurfgröße aufgetragen (Abb. 2), so ist zu bemerken, daß, wie

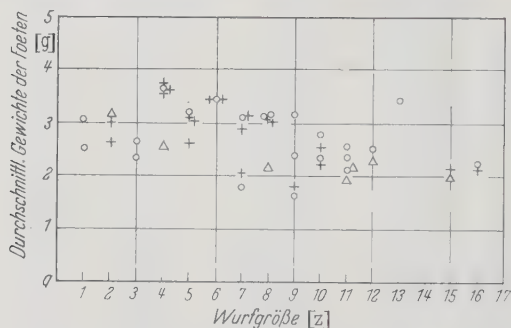


Abb. 2. Durchschnittliche Gewichte der Feten in Abhängigkeit der Wurfgröße (Zeichen-erklärung s. Abb. 1)

es nicht anders zu erwarten war, die Durchschnittsgewichte mit der Wurfgröße absinken. Die experimentell ermittelten Werte streuen jedoch so stark, daß eine diesbezügliche Korrelationsrechnung wenig sinnvoll erscheint. *Ebensowenig ist ein Anhalt dafür ersichtlich, daß die Hypophysektomie einen Einfluß auf das Durchschnittsgewicht der Feten hat.*

Zusammenfassung der Ergebnisse

Auf Grund unserer Untersuchungen und statistischen Berechnungen hat bei der angegebenen Versuchsanordnung die Hypophysektomie keinen Einfluß auf das Placentagewicht der Ratte. Auch die Scheinhypophysektomie beeinflusst das Placentagewicht nicht.

Ebensowenig werden die Durchschnittsgewichte der Feten, die mit zunehmender Wurfgröße absinken, durch die Hypophysektomie bzw. Scheinhypophysektomie beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen somit auf ein von der Hypophyse unabhängiges Wachstum der Placenta und des Feten in der 2. Hälfte der Gravidität hin.

Diese Feststellung zeigt erneut die umfassende, physiologische Bedeutung der Placenta und ihre zahlreichen, teilweise autonomen endokrinen Funktionen im mütterlichen und fetalen Organismus.

Zusammenfassung

Die eingangs gestellte Frage läßt sich somit wie folgt beantworten:

1. Die am 12. Tag der Gravidität bei der Ratte durchgeführte Hypophysektomie bzw. Scheinhypophysektomie beeinflußt nicht das Gewicht der am 20. Tag der Schwangerschaft entnommenen Placenten.

2. Die Durchschnittsgewichte der Rattenfeten, die mit zunehmender Wurfgröße absinken, werden durch die Hypophysektomie bzw. Scheinhypophysektomie nicht beeinflußt.

3. Die Rattenhypophyse hat in der 2. Schwangerschaftshälfte keinen Einfluß auf das Gewicht der Placenta und des Feten.

Literatur

- ¹ ASCHNER, B.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **146**, 1 (1912).
- ² BOMSKOV, CH.: Methodik der Hormonforschung, Bd. 2. Leipzig: Thieme 1939.
- ³ BÜTTNER, W.: Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. **39**, 601—664 (1939).
- ⁴ CAMPBELL, R. M., I. R. INNES and H. W. KOSTERLITZ: zit. n. E. KNOBIL u. W. L. CATON: Endocrinology **53**, 198 1(1953).
- ⁵ COLLIP, J. B., H. SELYE and D. W. THOMPSON: Nature (Lond.) **131**, 56 (1933).
- ⁶ — — — Virchows Arch. path. Anat. **290**, 24 (1933).
- ⁷ COLLIP, J. B., H. SELYE and D. L. THOMPSON: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **30**, 913 (1933).
- ⁸ CUTULY, E.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **47**, 126 (1941).
- ⁹ — Persönliche Mitteilung.
- ¹⁰ FIROZ, W. M.: Amer. J. Physiol. **104**, 204 (1933).
- ¹¹ GEBELEIN, H., u. H. J. HEITE: Statistische Urteilsbildung. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.
- ¹² GREER, M. A.: Endocrinology **45**, 179 (1949).
- ¹³ HATERIUS, H. O.: Anat. Rec. **54**, 343 (1932).
- ¹⁴ HOUSSAY, B. A.: C. R. Soc. Biol. (Paris) **113**, 472 (1933).
- ¹⁵ KNOBIL, E., and W. L. CATON: Endocrinology **53**, 198 (1933).
- ¹⁶ PENCHARZ, R. I., and J. A. LONG: Amer. J. Anat. **53**, 117 (1933).
- ¹⁷ — and W. R. LYONS: Science **74**, 206 (1931).
- ¹⁸ REISS, M., H. DRUCKREY and A. HOCHWALD: Endocrinology **12**, 243 (1933).
- ¹⁹ ROBSON, J. M.: Biol. Sci. **113**, 251 (1933).
- ²⁰ — Edinb. med. J. **43**, 395 (1936).
- ²¹ — J. Physiol. (Lond.) **95**, 83 (1939).
- ²² SELYE, H., J. B. COLLIP and D. L. THOMPSON: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **30**, 589 (1933).
- ²³ — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **31**, 82 (1933).
- ²⁴ — Endocrinology **17**, 495 (1933).
- ²⁵ STROBEL, E.: Endokrinologie (im Druck).
- ²⁶ — Endokrinologie (im Druck).
- ²⁷ WEISSCHEDEL, E.: Dtsch. Z. Chir. **259**, 223 (1943).
- ²⁸ WHITE, W. E., and S. L. LEONHARD: Anat. Rec. **54**, 270 (1932).
- ²⁹ WILLIG, H., u. H. SCHRIMPF: Ärztl. Forsch. **8**, 468 (1954).

Privatdozent Dr. E. STROBEL, Erlangen, Universitätsstraße 21—23,
Universitäts-Frauenklinik

